

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/JP05/002842

International filing date: 16 February 2005 (16.02.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: JP
Number: 2004-232961
Filing date: 10 August 2004 (10.08.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 07 April 2005 (07.04.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

16.02.2005

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日 2 0 0 4 年 8 月 1 0 日
Date of Application:

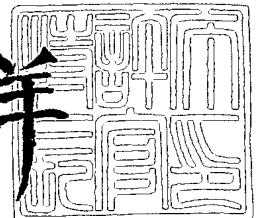
出 願 番 号 特 願 2 0 0 4 - 2 3 2 9 6 1
Application Number:
[ST. 10/C] : [J P 2 0 0 4 - 2 3 2 9 6 1]

出 願 人
Applicant(s): 山 中 伸 弥
 住 友 製 薬 株 式 会 社

2 0 0 5 年 3 月 2 5 日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

小 川 洋



【書類名】 特許願
【整理番号】 133279
【あて先】 特許庁長官殿
【国際特許分類】 C12Q 01/02
C12N 05/06
【発明者】
【住所又は居所】 大阪府大阪市天王寺区堂ヶ芝 2 - 9 - 7 - 1 4 0 1
【氏名】 山中 伸弥
【特許出願人】
【識別番号】 501219312
【氏名又は名称】 山中 伸弥
【特許出願人】
【識別番号】 000183370
【氏名又は名称】 住友製薬株式会社
【代理人】
【識別番号】 100121588
【弁理士】
【氏名又は名称】 五十部 穰
【電話番号】 06-6466-5214
【先の出願に基づく優先権主張】
【出願番号】 特願2004- 42337
【出願日】 平成16年 2月19日
【手数料の表示】
【予納台帳番号】 056546
【納付金額】 16,000円
【提出物件の目録】
【物件名】 特許請求の範囲 1
【物件名】 明細書 1
【物件名】 図面 1
【物件名】 要約書 1
【包括委任状番号】 0205876

【書類名】 特許請求の範囲**【請求項 1】**

以下の (a) および (b) の工程を含む、体細胞の核初期化物質のスクリーニング方法：

(a) E C A T 遺伝子の発現調節領域により発現調節を受ける位置にマーカー遺伝子を存在させた遺伝子を含有する体細胞と、被験物質とを接触させる工程、

(b) 前記 (a) の工程の後、マーカー遺伝子発現細胞の出現の有無を調べ、該細胞を出現させた被験物質を体細胞の核初期化候補物質として選択する工程。

【請求項 2】

E C A T 遺伝子が、E C A T 1 遺伝子、E C A T 2 遺伝子、E C A T 3 遺伝子、E C A T 4 遺伝子、E C A T 5 遺伝子、E C A T 6 遺伝子、E C A T 7 遺伝子、E C A T 8 遺伝子、E C A T 9 遺伝子および O c t 3 / 4 遺伝子から選択される 1 または 2 以上の遺伝子である、請求項 1 記載のスクリーニング方法。

【請求項 3】

マーカー遺伝子が、薬剤耐性遺伝子、蛍光タンパク質遺伝子、発光酵素遺伝子、発色酵素遺伝子またはこれらの組み合わせに係る遺伝子である、請求項 1 または 2 記載のスクリーニング方法。

【請求項 4】

体細胞が、E C A T 遺伝子にマーカー遺伝子をノックインした遺伝子を含有する体細胞である、請求項 1 ～ 3 いずれか記載のスクリーニング方法。

【請求項 5】

体細胞が、E C A T 遺伝子にマーカー遺伝子をノックインした遺伝子をホモで含有する体細胞である、請求項 4 記載のスクリーニング方法。

【請求項 6】

E C A T 遺伝子が E C A T 1 遺伝子、E C A T 2 遺伝子、E C A T 3 遺伝子、E C A T 4 遺伝子、E C A T 5 遺伝子、E C A T 6 遺伝子、E C A T 7 遺伝子、E C A T 8 遺伝子、E C A T 9 遺伝子および O c t 3 / 4 遺伝子から選択される 1 または 2 以上の遺伝子である、請求項 4 または 5 記載のスクリーニング方法。

【請求項 7】

以下の (a) および (b) の工程を含む、請求項 1 記載のスクリーニング方法：

(a) E C A T 2 遺伝子に薬剤耐性遺伝子を含む遺伝子をノックインした遺伝子を含有する体細胞と、被験物質とを接触させる工程、

(b) 前記 (a) の工程の後、選択培地中での生存細胞の有無を調べ、該生存細胞を生じさせた被験物質を体細胞の核初期化候補物質として選択する工程。

【請求項 8】

以下の (a) および (b) の工程を含む、請求項 1 記載のスクリーニング方法：

(a) E C A T 3 遺伝子に薬剤耐性遺伝子を含む遺伝子をノックインした遺伝子を含有する体細胞と、被験物質とを接触させる工程、

(b) 前記 (a) の工程の後、選択培地中での生存細胞の有無を調べ、該生存細胞を生じさせた被験物質を体細胞の核初期化候補物質として選択する工程。

【請求項 9】

以下の (a) および (b) の工程を含む、請求項 1 記載のスクリーニング方法：

(a) E C A T 5 遺伝子に薬剤耐性遺伝子を含む遺伝子をノックインした遺伝子を含有する体細胞と、被験物質とを接触させる工程、

(b) 前記 (a) の工程の後、選択培地中での生存細胞の有無を調べ、該生存細胞を生じさせた被験物質を体細胞の核初期化候補物質として選択する工程。

【請求項 10】

以下の (a) および (b) の工程を含む、請求項 1 記載のスクリーニング方法：

(a) E C A T 2 遺伝子および E C A T 3 遺伝子に、それぞれ薬剤耐性遺伝子を含む遺伝子をノックインした遺伝子を含有する体細胞と、被験物質とを接触させる工程、

(b) 前記 (a) の工程の後、選択培地中での生存細胞の有無を調べ、該生存細胞を生じさせた被験物質を体細胞の核初期化候補物質として選択する工程。

【請求項 11】

E C A T 2 遺伝子と E C A T 3 遺伝子が、それぞれ異なる薬剤耐性遺伝子でノックインされている、請求項 10 記載のスクリーニング方法。

【請求項 12】

体細胞が、E C A T 遺伝子に薬剤耐性遺伝子を含む遺伝子をノックインした遺伝子をホモで含有する体細胞である、請求項 7～11 いずれか記載のスクリーニング方法。

【請求項 13】

以下の (a) および (b) の工程を含む、請求項 1 記載のスクリーニング方法：

(a) E C A T 4 遺伝子に薬剤耐性遺伝子を含む遺伝子をノックインした遺伝子を含有する体細胞と、被験物質とを接触させる工程、

(b) 前記 (a) の工程の後、選択培地中での生存細胞の有無を調べ、該生存細胞を生じさせた被験物質を体細胞の核初期化候補物質として選択する工程。

【請求項 14】

体細胞が、E C A T 遺伝子に薬剤耐性遺伝子を含む遺伝子をノックインした遺伝子をヘテロで含有する体細胞である、請求項 13 記載のスクリーニング方法。

【請求項 15】

請求項 1～14 いずれか記載のスクリーニング方法を用いて選択される核初期化物質。

【請求項 16】

E S 細胞由来の遺伝子またはタンパク質である、請求項 15 記載の核初期化物質。

【請求項 17】

E C A T 遺伝子にマーカー遺伝子をノックインした遺伝子を含有するノックインマウスの、請求項 1～14 いずれか記載のスクリーニング方法において用いる体細胞の供給源としての使用。

【請求項 18】

ノックインマウスが、E C A T 遺伝子にマーカー遺伝子をノックインした遺伝子をホモで含有するノックインマウスである、請求項 17 記載の使用。

【請求項 19】

E C A T 遺伝子が E C A T 1 遺伝子、E C A T 2 遺伝子、E C A T 3 遺伝子、E C A T 4 遺伝子、E C A T 5 遺伝子、E C A T 6 遺伝子、E C A T 7 遺伝子、E C A T 8 遺伝子、E C A T 9 遺伝子および O c t 3 / 4 遺伝子から選択される 1 または 2 以上の遺伝子である、請求項 17 または 18 記載の使用。

【請求項 20】

マーカー遺伝子が、薬剤耐性遺伝子、蛍光タンパク質遺伝子、発光酵素遺伝子、発色酵素遺伝子またはこれらの組み合わせに係る遺伝子である、請求項 17～19 いずれか記載の使用。

【請求項 21】

E C A T 遺伝子の発現調節領域により発現調節を受ける位置にマーカー遺伝子を存在させた遺伝子を含有する体細胞。

【請求項 22】

E C A T 遺伝子が E C A T 1 遺伝子、E C A T 2 遺伝子、E C A T 3 遺伝子、E C A T 4 遺伝子、E C A T 5 遺伝子、E C A T 6 遺伝子、E C A T 7 遺伝子、E C A T 8 遺伝子、E C A T 9 遺伝子および O c t 3 / 4 遺伝子から選択される 1 または 2 以上の遺伝子である、請求項 21 記載の体細胞。

【請求項 23】

マーカー遺伝子が、薬剤耐性遺伝子、蛍光タンパク質遺伝子、発光酵素遺伝子、発色酵素遺伝子またはこれらの組み合わせに係る遺伝子である、請求項 21 または 22 記載の体細胞。

【請求項 24】

E C A T 遺伝子にマーカー遺伝子をノックインした遺伝子を含有する、請求項 21～23 いずれか記載の体細胞。

【請求項 25】

E C A T 遺伝子にマーカー遺伝子をノックインした遺伝子をホモで含有する、請求項 24 記載の体細胞。

【請求項 26】

以下の (a) および (b) の工程を含む、E S 様細胞の選択方法：

(a) E C A T 遺伝子の発現調節領域により発現調節を受ける位置にマーカー遺伝子を存在させた遺伝子を含有する体細胞と、体細胞の核初期化物質とを接触させる工程、

(b) 前記 (a) の工程の後、マーカー遺伝子発現細胞を E S 様細胞として選択する工程。

【請求項 27】

E C A T 遺伝子が、E C A T 1 遺伝子、E C A T 2 遺伝子、E C A T 3 遺伝子、E C A T 4 遺伝子、E C A T 5 遺伝子、E C A T 6 遺伝子、E C A T 7 遺伝子、E C A T 8 遺伝子、E C A T 9 遺伝子および O c t 3 / 4 遺伝子から選択される 1 または 2 以上の遺伝子である、請求項 26 記載の選択方法。

【請求項 28】

マーカー遺伝子が、薬剤耐性遺伝子、蛍光タンパク質遺伝子、発光酵素遺伝子、発色酵素遺伝子またはこれらの組み合わせに係る遺伝子である、請求項 26 または 27 記載の選択方法。

【請求項 29】

以下の (a) および (b) の工程を含む、請求項 26 記載の選択方法：

(a) E C A T 2 遺伝子の発現調節領域により発現調節を受ける位置に薬剤耐性遺伝子を存在させた遺伝子を含有する体細胞と、体細胞の核初期化物質とを接触させる工程、

(b) 前記 (a) の工程の後、選択培地中での生存細胞を E S 様細胞として選択する工程。

【請求項 30】

以下の (a) および (b) の工程を含む、請求項 26 記載の選択方法：

(a) E C A T 3 遺伝子の発現調節領域により発現調節を受ける位置に薬剤耐性遺伝子を存在させた遺伝子を含有する体細胞と、体細胞の核初期化物質とを接触させる工程、

(b) 前記 (a) の工程の後、選択培地中での生存細胞を E S 様細胞として選択する工程。

【請求項 31】

以下の (a) および (b) の工程を含む、請求項 26 記載の選択方法：

(a) E C A T 5 遺伝子の発現調節領域により発現調節を受ける位置に薬剤耐性遺伝子を存在させた遺伝子を含有する体細胞と、体細胞の核初期化物質とを接触させる工程、

(b) 前記 (a) の工程の後、選択培地中での生存細胞を E S 様細胞として選択する工程。

【請求項 32】

以下の (a) および (b) の工程を含む、請求項 26 記載の選択方法：

(a) E C A T 2 遺伝子および E C A T 3 遺伝子の発現調節領域により発現調節を受ける位置に薬剤耐性遺伝子を存在させた遺伝子を含有する体細胞と、体細胞の核初期化物質とを接触させる工程、

(b) 前記 (a) の工程の後、選択培地中での生存細胞を E S 様細胞として選択する工程。

【請求項 33】

E C A T 2 遺伝子および E C A T 3 遺伝子の発現調節領域により発現調節を受ける位置に、それぞれ異なる薬剤耐性遺伝子が存在する、請求項 32 記載の選択方法。

【請求項 34】

以下の (a) および (b) の工程を含む、請求項 26 記載の選択方法：

- (a) ECAT4 遺伝子の発現調節領域により発現調節を受ける位置に薬剤耐性遺伝子を存在させた遺伝子を含有する体細胞と、体細胞の核初期化物質とを接触させる工程、
(b) 前記 (a) の工程の後、選択培地中での生存細胞を ES 様細胞として選択する工程。

【請求項 35】

請求項 21～25 いずれか記載の体細胞の、請求項 1～14 いずれか記載のスクリーニング方法または請求項 26～34 いずれか記載の選択方法における使用。

【請求項 36】

請求項 1～14 いずれか記載のスクリーニング方法において出現したマーカー遺伝子発現細胞または生存細胞、若しくは請求項 26～34 いずれか記載の選択方法において選択された ES 様細胞。

【請求項 37】

以下の (a) および (b) の工程を含む、ES 細胞の未分化・多能性維持物質のスクリーニング方法：

(a) ECAT 遺伝子の発現調節領域により発現調節を受ける位置にマーカー遺伝子を存在させた遺伝子を含有する ES 細胞を、ES 細胞の未分化・多能性を維持できない培地中で被験物質と接触させる工程、

(b) 前記 (a) の工程の後、マーカー遺伝子発現細胞の存在の有無を調べ、該細胞を存在させた被験物質を ES 細胞未分化・多能性維持の候補物質として選択する工程。

【請求項 38】

ECAT 遺伝子が、ECAT1 遺伝子、ECAT2 遺伝子、ECAT3 遺伝子、ECAT4 遺伝子、ECAT5 遺伝子、ECAT6 遺伝子、ECAT7 遺伝子、ECAT8 遺伝子、ECAT9 遺伝子および Oct3/4 遺伝子から選択される 1 または 2 以上の遺伝子である、請求項 37 記載のスクリーニング方法。

【請求項 39】

マーカー遺伝子が、薬剤耐性遺伝子、蛍光タンパク質遺伝子、発光酵素遺伝子、発色酵素遺伝子またはこれらの組み合わせに係る遺伝子である、請求項 37 または 38 記載のスクリーニング方法。

【請求項 40】

ES 細胞が、ECAT 遺伝子にマーカー遺伝子をノックインした遺伝子を含有する ES 細胞である、請求項 37～39 いずれか記載のスクリーニング方法。

【請求項 41】

ES 細胞が、ECAT 遺伝子にマーカー遺伝子をノックインした遺伝子をホモで含有する ES 細胞である、請求項 40 記載のスクリーニング方法。

【請求項 42】

ECAT 遺伝子が ECAT1 遺伝子、ECAT2 遺伝子、ECAT3 遺伝子、ECAT4 遺伝子、ECAT5 遺伝子、ECAT6 遺伝子、ECAT7 遺伝子、ECAT8 遺伝子、ECAT9 遺伝子および Oct3/4 遺伝子から選択される 1 または 2 以上の遺伝子である、請求項 40 または 41 記載のスクリーニング方法。

【請求項 43】

以下の (a) および (b) の工程を含む、請求項 37 記載のスクリーニング方法：

(a) ECAT2 遺伝子に薬剤耐性遺伝子を含む遺伝子をノックインした遺伝子を含有する ES 細胞を、ES 細胞の未分化・多能性を維持できない培地中で被験物質と接触させる工程、

(b) 前記 (a) の工程の後、選択培地中での生存細胞の有無を調べ、該生存細胞を存在させた被験物質を ES 細胞未分化・多能性維持の候補物質として選択する工程。

【請求項 44】

以下の (a) および (b) の工程を含む、請求項 37 記載のスクリーニング方法：

(a) ECAT3 遺伝子に薬剤耐性遺伝子を含む遺伝子をノックインした遺伝子を含有する ES 細胞を、ES 細胞の未分化・多能性を維持できない培地中で被験物質と接触させる

工程、

(b) 前記 (a) の工程の後、選択培地中での生存細胞の有無を調べ、該生存細胞を存在させた被験物質を E S 細胞未分化・多能性維持の候補物質として選択する工程。

【請求項 45】

以下の (a) および (b) の工程を含む、請求項 37 記載のスクリーニング方法：

(a) E C A T 5 遺伝子に薬剤耐性遺伝子を含む遺伝子をノックインした遺伝子を含有する E S 細胞を、E S 細胞の未分化・多能性を維持できない培地中で被験物質と接触させる工程、

(b) 前記 (a) の工程の後、選択培地中での生存細胞の有無を調べ、該生存細胞を存在させた被験物質を E S 細胞未分化・多能性維持の候補物質として選択する工程。

【請求項 46】

以下の (a) および (b) の工程を含む、請求項 37 記載のスクリーニング方法：

(a) E C A T 2 遺伝子および E C A T 3 遺伝子に、それぞれ薬剤耐性遺伝子を含む遺伝子をノックインした遺伝子を含有する E S 細胞を、E S 細胞の未分化・多能性を維持できない培地中で被験物質と接触させる工程、

(b) 前記 (a) の工程の後、選択培地中での生存細胞の有無を調べ、該生存細胞を存在させた被験物質を E S 細胞未分化・多能性維持の候補物質として選択する工程。

【請求項 47】

E C A T 2 遺伝子と E C A T 3 遺伝子が、それぞれ異なる薬剤耐性遺伝子でノックインされている、請求項 46 記載のスクリーニング方法。

【請求項 48】

E S 細胞が、E C A T 遺伝子に薬剤耐性遺伝子を含む遺伝子をノックインした遺伝子をホモで含有する E S 細胞である、請求項 43～47 いずれか記載のスクリーニング方法。

【請求項 49】

以下の (a) および (b) の工程を含む、請求項 37 記載のスクリーニング方法：

(a) E C A T 4 遺伝子に薬剤耐性遺伝子を含む遺伝子をノックインした遺伝子を含有する E S 細胞を、E S 細胞の未分化・多能性を維持できない培地中で被験物質と接触させる工程、

(b) 前記 (a) の工程の後、選択培地中での生存細胞の有無を調べ、該生存細胞を存在させた被験物質を E S 細胞未分化・多能性維持の候補物質として選択する工程。

【請求項 50】

E S 細胞が、E C A T 遺伝子に薬剤耐性遺伝子を含む遺伝子をノックインした遺伝子をヘテロで含有する E S 細胞である、請求項 49 記載のスクリーニング方法。

【請求項 51】

請求項 37～50 いずれか記載のスクリーニング方法を用いて選択される E S 細胞の未分化・多能性維持物質。

【請求項 52】

フィーダー細胞の分泌産物である、請求項 51 記載の E S 細胞の未分化・多能性維持物質。

【請求項 53】

血清由来成分である、請求項 51 記載の E S 細胞の未分化・多能性維持物質。

【請求項 54】

E C A T 遺伝子にマーカー遺伝子をノックインした遺伝子を含有するノックインマウスの、請求項 37～50 いずれか記載のスクリーニング方法において用いる E S 細胞の供給源としての使用。

【請求項 55】

ノックインマウスが、E C A T 遺伝子にマーカー遺伝子をノックインした遺伝子をホモで含有するノックインマウスである、請求項 54 記載の使用。

【請求項 56】

E C A T 遺伝子が E C A T 1 遺伝子、E C A T 2 遺伝子、E C A T 3 遺伝子、E C A T

4 遺伝子、E C A T 5 遺伝子、E C A T 6 遺伝子、E C A T 7 遺伝子、E C A T 8 遺伝子、E C A T 9 遺伝子および O c t 3 / 4 遺伝子から選択される 1 または 2 以上の遺伝子である、請求項 5 4 または 5 5 記載の使用。

【請求項 5 7】

マーカー遺伝子が、薬剤耐性遺伝子、蛍光タンパク質遺伝子、発光酵素遺伝子、発色酵素遺伝子またはこれらの組み合わせに係る遺伝子である、請求項 5 4 ～ 5 6 いずれか記載の使用。

【請求項 5 8】

E C A T 遺伝子の発現調節領域により発現調節を受ける位置にマーカー遺伝子を存在させた遺伝子を含有する E S 細胞。

【請求項 5 9】

E C A T 遺伝子が E C A T 1 遺伝子、E C A T 2 遺伝子、E C A T 3 遺伝子、E C A T 4 遺伝子、E C A T 5 遺伝子、E C A T 6 遺伝子、E C A T 7 遺伝子、E C A T 8 遺伝子、E C A T 9 遺伝子および O c t 3 / 4 遺伝子から選択される 1 または 2 以上の遺伝子である、請求項 5 8 記載の E S 細胞。

【請求項 6 0】

マーカー遺伝子が、薬剤耐性遺伝子、蛍光タンパク質遺伝子、発光酵素遺伝子、発色酵素遺伝子またはこれらの組み合わせに係る遺伝子である、請求項 5 8 または 5 9 記載の E S 細胞。

【請求項 6 1】

E C A T 遺伝子にマーカー遺伝子をノックインした遺伝子を含有する、請求項 5 8 ～ 6 0 いずれか記載の E S 細胞。

【請求項 6 2】

E C A T 遺伝子にマーカー遺伝子をノックインした遺伝子をホモで含有する、請求項 6 1 記載の E S 細胞。

【請求項 6 3】

請求項 5 8 ～ 6 2 いずれか記載の E S 細胞の、請求項 3 7 ～ 5 0 いずれか記載のスクリーニング方法における使用。

【書類名】明細書

【発明の名称】体細胞核初期化物質のスクリーニング方法

【技術分野】

【0001】

本発明は、体細胞核初期化物質の新規なスクリーニング方法に関する。より詳細には、本発明は、ECAT遺伝子を利用し、ES様細胞化をマーカー遺伝子の発現でモニターすることにより、体細胞からES様細胞への変換を誘導する物質（体細胞の核初期化（Nuclear reprogramming）を誘導する物質）を効率的に同定する方法に関する。また本発明は、ECAT遺伝子を利用し、ES様細胞化をマーカー遺伝子の発現でモニターすることにより、ES様細胞を効率的に選択する方法に関する。さらに本発明は、ECAT遺伝子を利用し、ES細胞の未分化・多能性維持（ES細胞としての状態維持）をマーカー遺伝子の発現でモニターすることにより、ES細胞の未分化・多能性維持物質を効率的に選択する方法に関する。

【背景技術】

【0002】

胚性幹細胞（ES細胞）は哺乳動物胚盤胞の内部細胞塊より樹立した幹細胞であり、すべての細胞へと分化する能力（分化多能性）を維持したまま、無限に増殖させることができる。この特性から、ES細胞から大量合成した心筋細胞や神経細胞を心筋梗塞やパーキンソン病患者に移植して治療する幹細胞療法が期待されている。しかしES細胞にはヒト受精卵を利用し、犠牲にするという致命的とも言える倫理的問題が存在する。一方、生体の各組織には神経幹細胞、造血幹細胞、間葉系幹細胞などの組織幹細胞が存在する。組織幹細胞は受精卵を使わないので倫理的問題が無く、また患者自身の細胞を使えるので拒絶反応も回避することができる。しかし組織幹細胞は単離が難しく、増殖能や分化能もES細胞に比べると比べものにならないほど限られている。組織幹細胞や分化細胞等の体細胞を何らかの手段により高い増殖能と分化多能性を有するES細胞に類似した細胞に変換することができたなら、このES様細胞は臨床応用にとって理想的な幹細胞となる。具体的には、例えば患者の体細胞を採取し、これを核初期化因子（核初期化を誘導する因子）で刺激してES様細胞に変換し、これを幹細胞として臨床応用することが期待される。しかしながら、そのような核初期化因子の探索を効率良く行える系は存在していない。

【0003】

ECAT遺伝子（ES cell associated transcript gene）は、ES細胞等の分化全能性細胞で特異的に発現する遺伝子の総称である。これまでにECAT遺伝子として報告されているものとしては、転写因子Oct3（Oct4、POU5f1とも呼ばれる。以下Oct3/4という）遺伝子が知られている。また、同様な遺伝子がヒトでも報告されているが（hOct3/4遺伝子；非特許文献1を参照）、hOct-3/4遺伝子についてはES細胞特異的な発現を証明したという報告はない。

【0004】

近年我々のグループは、ESTデータベースを利用したコンピューター解析およびノザンブロット解析に基づき、ES細胞で特異的に発現する9個の遺伝子を見出し、これをECAT1遺伝子、ECAT2遺伝子、ECAT3遺伝子、ECAT4遺伝子、ECAT5遺伝子、ECAT6遺伝子、ECAT7遺伝子、ECAT8遺伝子、およびECAT9遺伝子と命名した（特許文献1を参照）。このうちECAT4はNanogとも呼ばれる因子であり、ES細胞が有する全能性（分化多能性）の維持に必須の因子であることが明らかとなった（非特許文献2を参照）。またECAT5はERasとも呼ばれる因子であり、ES細胞の増殖を促進する因子であることが明らかになっている（非特許文献3を参照）。

【0005】

またECAT3はF-box含有タンパクの1種、Fbx15であり、F-boxを有することからユビキチンリガーゼであると考えられている。ECAT3遺伝子の発現調節領域を解析した結果、ES細胞特異的転写因子であるOct4とSox2の2つにより協調的に発現調節を受けていることが明らかとなった（非特許文献4を参照）。

ECAT3の機能を調べるために、ECAT3遺伝子のコーディング領域に β geo（ β ガラクトシ

ダーゼとネオマイシン耐性遺伝子の融合遺伝子)をノックインして作製したノックインマウスを解析した結果、当該マウスには明らかな異常が認められず、またホモ変異ES細胞にも増殖や分化能において明らかな異常は認められなかった。このことからECAT3遺伝子は、ES細胞の維持や増殖にとって必須の因子ではないと考えられている(非特許文献4を参照)。

【0006】

【特許文献1】WO 02/097090 号公報

【非特許文献1】Takeda et al., Nucleic Acids Research, 20:4613-4620(1992)

【非特許文献2】Mitsui, K., et al., Cell, 113: 631-642(2003)

【非特許文献3】Takahashi, K., et al., Nature, 423: 541-545(2003)

【非特許文献4】Tokuzawa, Y., et al., Molecular and Cellular Biology, 23(8): 2699-2708(2003)

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

本発明の目的は、ECAT遺伝子を利用し、ES類似細胞を効率良く選択するシステムと、同システムを利用した体細胞(組織幹細胞、分化細胞)の核初期化物質のスクリーニング法を提供することにある。また本発明の別の目的は、ECAT遺伝子を利用した、ES細胞の未分化・多能性維持物質のスクリーニング方法を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0008】

前述のように、体細胞を何らかの手段により高い増殖能と分化多能性を有するES細胞に類似した細胞に変換することができたなら、このES様細胞は臨床応用にとって理想的な幹細胞となる。本発明者はこのようなES様細胞への変換を誘導する物質(体細胞の核初期化物質)を効率的にスクリーニングすることの可能な方法につき鋭意検討した。

【0009】

本発明者はまず、ECAT遺伝子の発現調節領域により発現調節を受ける位置にマーカー遺伝子を存在させた体細胞を作製した。具体的には、ECAT3遺伝子にマーカー遺伝子である β geo遺伝子をノックインしたノックインマウスから体細胞(リンパ球)を調製した。この体細胞をES細胞の培養条件で培養し、G418で選択したところ、全て死滅し、薬剤耐性コロニーは一つも得られなかった。一方、前記体細胞を正常ES細胞と融合し、ES細胞の培養条件で培養し、G418で選択したところ、生存細胞が出現した。この生存細胞を解析した結果、ECAT4やOct3/4を発現し、ES細胞としての性質を有するES様細胞であることが分かった。以上の実験結果より、体細胞とES細胞との融合により体細胞の核が初期化(リプログラミング)されたためにES様細胞が出現し、そしてECAT3遺伝子に置き換えられた β geoが発現して薬剤耐性となったことが明らかとなった。

【0010】

以上のようにECAT3遺伝子の発現調節領域により発現調節を受ける位置にマーカー遺伝子を存在させた遺伝子含有する体細胞は、ES様細胞に変換された時にのみ、マーカー遺伝子が発現する。すなわちES様細胞への変換を薬剤耐性等のマーカー遺伝子の発現で容易にモニターすることができる。この性質を利用すれば、体細胞からES様細胞への変換を誘導する核初期化因子を、薬剤耐性等のマーカー遺伝子の発現を指標として効率的にスクリーニングすることができる。また同様に、前記マーカー遺伝子の発現を指標として、ES様細胞を効率的に選択することができる。

本発明者らはさらに、ECAT3のみならず、ECAT2やECAT5等の他のECATに関しても、前記スクリーニングやES様細胞の選択に利用できることを見出した。ECAT遺伝子(ECAT1遺伝子、ECAT2遺伝子、ECAT3遺伝子、ECAT4遺伝子、ECAT5遺伝子、ECAT6遺伝子、ECAT7遺伝子、ECAT8遺伝子、ECAT9遺伝子およびOct3/4遺伝子)はいずれもES細胞で特異的に発現する遺伝子であることが知られているため、いずれのECATについても前記のスクリーニングに用いることができる。特に、ECAT遺伝子をノックイン等の手法により破壊する場合には、

ES細胞の維持や増殖において必須ではないECAT2およびECAT3が非常に有効に利用される。

【0011】

さらに「ES様細胞への変換を薬剤耐性等のマーカー遺伝子の発現で容易にモニターする」という前記システムは、ES細胞の未分化・多能性維持物質のスクリーニングにも応用することができる。マウスES細胞はサイトカインLIFにより未分化・多能性が維持できる。さらに細胞数が多いときはLIFを添加した無血清培地によりフィーダー細胞を用いずに維持することができる。しかし低密度では血清もしくはフィーダー細胞が必須である。これは血清やフィーダー細胞の分泌産物にLIF以外のES細胞維持因子が含まれることを示す。またヒトES細胞もマウスフィーダー細胞上で一部の細胞は未分化・多能性が維持されるが、全ての細胞を未分化状態で維持することはできない。さらにマウスES細胞と異なりヒトES細胞ではLIFは無効である。これはやはり、フィーダー細胞がLIF以外のES細胞未分化・多能性維持因子を分泌することを示唆すると同時に、フィーダー細胞分泌産物とも異なる更なる因子の必要性を示唆している。ヒトES細胞を臨床応用する場合、動物血清やフィーダー細胞を用いずに培養することが必須であり、ES細胞の未分化・多能性維持因子の同定が求められている状況にあるが、効率的な同定法は未だ見出されていない。

本発明の前記システムによれば、ES細胞状態を薬剤耐性等のマーカー遺伝子の発現で容易にモニターすることができるため、例えばES細胞状態を維持できない培養条件下に被験物質を添加し、マーカー遺伝子発現細胞の存在の有無を調べることにより、ES細胞の未分化・多能性維持（候補）物質を容易にスクリーニングすることができる。

本発明はこのような知見に基づき完成するに至ったものである。

【0012】

すなわち本発明は、下記に掲げるものである：

(1) 以下の(a)および(b)の工程を含む、体細胞の核初期化物質のスクリーニング方法：

(a) ECAT遺伝子の発現調節領域により発現調節を受ける位置にマーカー遺伝子存在させた遺伝子を含む体細胞と、被験物質とを接触させる工程、

(b) 前記(a)の工程の後、マーカー遺伝子発現細胞の出現の有無を調べ、該細胞を出現させた被験物質を体細胞の核初期化候補物質として選択する工程、

(2) ECAT遺伝子が、ECAT1遺伝子、ECAT2遺伝子、ECAT3遺伝子、ECAT4遺伝子、ECAT5遺伝子、ECAT6遺伝子、ECAT7遺伝子、ECAT8遺伝子、ECAT9遺伝子およびOct3/4遺伝子から選択される1または2以上の遺伝子である、前記(1)記載のスクリーニング方法、

(3) マーカー遺伝子が、薬剤耐性遺伝子、蛍光タンパク質遺伝子、発光酵素遺伝子、発色酵素遺伝子またはこれらの組み合わせに係る遺伝子である、前記(1)または(2)記載のスクリーニング方法、

(4) 体細胞が、ECAT遺伝子にマーカー遺伝子をノックインした遺伝子を含む体細胞である、前記(1)～(3)いずれか記載のスクリーニング方法、

(5) 体細胞が、ECAT遺伝子にマーカー遺伝子をノックインした遺伝子をホモで含む体細胞である、前記(4)記載のスクリーニング方法、

(6) ECAT遺伝子がECAT1遺伝子、ECAT2遺伝子、ECAT3遺伝子、ECAT4遺伝子、ECAT5遺伝子、ECAT6遺伝子、ECAT7遺伝子、ECAT8遺伝子、ECAT9遺伝子およびOct3/4遺伝子から選択される1または2以上の遺伝子である、前記(4)または(5)記載のスクリーニング方法、

【0013】

(7) 以下の(a)および(b)の工程を含む、前記(1)記載のスクリーニング方法：

(a) ECAT2遺伝子に薬剤耐性遺伝子を含む遺伝子をノックインした遺伝子を含む体細胞と、被験物質とを接触させる工程、

(b) 前記(a)の工程の後、選択培地中での生存細胞の有無を調べ、該生存細胞を生じさせた被験物質を体細胞の核初期化候補物質として選択する工程、

- (8) 以下の (a) および (b) の工程を含む、前記 (1) 記載のスクリーニング方法:
- (a) ECAT3 遺伝子に薬剤耐性遺伝子を含む遺伝子をノックインした遺伝子を含有する体細胞と、被験物質とを接触させる工程、
 - (b) 前記 (a) の工程の後、選択培地中での生存細胞の有無を調べ、該生存細胞を生じさせた被験物質を体細胞の核初期化候補物質として選択する工程、
- (9) 以下の (a) および (b) の工程を含む、前記 (1) 記載のスクリーニング方法:
- (a) ECAT5 遺伝子に薬剤耐性遺伝子を含む遺伝子をノックインした遺伝子を含有する体細胞と、被験物質とを接触させる工程、
 - (b) 前記 (a) の工程の後、選択培地中での生存細胞の有無を調べ、該生存細胞を生じさせた被験物質を体細胞の核初期化候補物質として選択する工程、
- (10) 以下の (a) および (b) の工程を含む、前記 (1) 記載のスクリーニング方法:
- (a) ECAT2 遺伝子および ECAT3 遺伝子に、それぞれ薬剤耐性遺伝子を含む遺伝子をノックインした遺伝子を含有する体細胞と、被験物質とを接触させる工程、
 - (b) 前記 (a) の工程の後、選択培地中での生存細胞の有無を調べ、該生存細胞を生じさせた被験物質を体細胞の核初期化候補物質として選択する工程、
- (11) ECAT2 遺伝子と ECAT3 遺伝子が、それぞれ異なる薬剤耐性遺伝子でノックインされている、前記 (10) 記載のスクリーニング方法、
- (12) 体細胞が、ECAT 遺伝子に薬剤耐性遺伝子を含む遺伝子をノックインした遺伝子をホモで含有する体細胞である、前記 (7) ~ (11) いずれか記載のスクリーニング方法、
- (13) 以下の (a) および (b) の工程を含む、前記 (1) 記載のスクリーニング方法:
- (a) ECAT4 遺伝子に薬剤耐性遺伝子を含む遺伝子をノックインした遺伝子を含有する体細胞と、被験物質とを接触させる工程、
 - (b) 前記 (a) の工程の後、選択培地中での生存細胞の有無を調べ、該生存細胞を生じさせた被験物質を体細胞の核初期化候補物質として選択する工程、
- (14) 体細胞が、ECAT 遺伝子に薬剤耐性遺伝子を含む遺伝子をノックインした遺伝子をヘテロで含有する体細胞である、前記 (13) 記載のスクリーニング方法、
- 【0014】**
- (15) 前記 (1) ~ (14) いずれか記載のスクリーニング方法を用いて選択される核初期化物質、
- (16) ES 細胞由来の遺伝子またはタンパク質である、前記 (15) 記載の核初期化物質、
- 【0015】**
- (17) ECAT 遺伝子にマーカー遺伝子をノックインした遺伝子を含有するノックインマウスの、前記 (1) ~ (14) いずれか記載のスクリーニング方法において用いる体細胞の供給源としての使用、
- (18) ノックインマウスが、ECAT 遺伝子にマーカー遺伝子をノックインした遺伝子をホモで含有するノックインマウスである、前記 (17) 記載の使用、
- (19) ECAT 遺伝子が ECAT1 遺伝子、ECAT2 遺伝子、ECAT3 遺伝子、ECAT4 遺伝子、ECAT5 遺伝子、ECAT6 遺伝子、ECAT7 遺伝子、ECAT8 遺伝子、ECAT9 遺伝子および Oct3/4 遺伝子から選択される 1 または 2 以上の遺伝子である、前記 (17) または (18) 記載の使用、
- (20) マーカー遺伝子が、薬剤耐性遺伝子、蛍光タンパク質遺伝子、発光酵素遺伝子、発色酵素遺伝子またはこれらの組み合わせに係る遺伝子である、前記 (17) ~ (19) いずれか記載の使用、

【0016】

(21) ECAT遺伝子の発現調節領域により発現調節を受ける位置にマーカー遺伝子を存在させた遺伝子を含有する体細胞、

(22) ECAT遺伝子がECAT1遺伝子、ECAT2遺伝子、ECAT3遺伝子、ECAT4遺伝子、ECAT5遺伝子、ECAT6遺伝子、ECAT7遺伝子、ECAT8遺伝子、ECAT9遺伝子およびOct3/4遺伝子から選択される1または2以上の遺伝子である、前記(21)記載の体細胞、

(23) マーカー遺伝子が、薬剤耐性遺伝子、蛍光タンパク質遺伝子、発光酵素遺伝子、発色酵素遺伝子またはこれらの組み合わせに係る遺伝子である、前記(21)または(22)記載の体細胞、

(24) ECAT遺伝子にマーカー遺伝子をノックインした遺伝子を含有する、前記(21)～(23)いずれか記載の体細胞、

(25) ECAT遺伝子にマーカー遺伝子をノックインした遺伝子をホモで含有する、前記(24)記載の体細胞、

【0017】

(26) 以下の(a)および(b)の工程を含む、ES様細胞の選択方法:

(a) ECAT遺伝子の発現調節領域により発現調節を受ける位置にマーカー遺伝子を存在させた遺伝子を含有する体細胞と、体細胞の核初期化物質とを接触させる工程、

(b) 前記(a)の工程の後、マーカー遺伝子発現細胞をES様細胞として選択する工程、

(27) ECAT遺伝子が、ECAT1遺伝子、ECAT2遺伝子、ECAT3遺伝子、ECAT4遺伝子、ECAT5遺伝子、ECAT6遺伝子、ECAT7遺伝子、ECAT8遺伝子、ECAT9遺伝子およびOct3/4遺伝子から選択される1または2以上の遺伝子である、前記(26)記載の選択方法、

(28) マーカー遺伝子が、薬剤耐性遺伝子、蛍光タンパク質遺伝子、発光酵素遺伝子、発色酵素遺伝子またはこれらの組み合わせに係る遺伝子である、前記(26)または(27)記載の選択方法、

(29) 以下の(a)および(b)の工程を含む、前記(26)記載の選択方法:

(a) ECAT2遺伝子の発現調節領域により発現調節を受ける位置に薬剤耐性遺伝子を存在させた遺伝子を含有する体細胞と、体細胞の核初期化物質とを接触させる工程、

(b) 前記(a)の工程の後、選択培地中での生存細胞をES様細胞として選択する工程、

(30) 以下の(a)および(b)の工程を含む、前記(26)記載の選択方法:

(a) ECAT3遺伝子の発現調節領域により発現調節を受ける位置に薬剤耐性遺伝子を存在させた遺伝子を含有する体細胞と、体細胞の核初期化物質とを接触させる工程、

(b) 前記(a)の工程の後、選択培地中での生存細胞をES様細胞として選択する工程、

(31) 以下の(a)および(b)の工程を含む、前記(26)記載の選択方法:

(a) ECAT5遺伝子の発現調節領域により発現調節を受ける位置に薬剤耐性遺伝子を存在させた遺伝子を含有する体細胞と、体細胞の核初期化物質とを接触させる工程、

(b) 前記(a)の工程の後、選択培地中での生存細胞をES様細胞として選択する工程、

(32) 以下の(a)および(b)の工程を含む、前記(26)記載の選択方法:

(a) ECAT2遺伝子およびECAT3遺伝子の発現調節領域により発現調節を受ける位置に薬剤耐性遺伝子を存在させた遺伝子を含有する体細胞と、体細胞の核初期化物質とを接触させる工程、

(b) 前記(a)の工程の後、選択培地中での生存細胞をES様細胞として選択する工程、

(33) ECAT2遺伝子およびECAT3遺伝子の発現調節領域により発現調節を受ける位置に、それぞれ異なる薬剤耐性遺伝子が存在する、前記(32)記載の選択方法、

(34) 以下の(a)および(b)の工程を含む、前記(26)記載の選択方法:

(a) ECAT4 遺伝子の発現調節領域により発現調節を受ける位置に薬剤耐性遺伝子を存在させた遺伝子を含有する体細胞と、体細胞の核初期化物質とを接触させる工程、

(b) 前記 (a) の工程の後、選択培地中での生存細胞を ES 様細胞として選択する工程、

(35) 体細胞が、ECAT 遺伝子発現調節領域により発現調節を受ける位置にマーカー遺伝子を挿入したベクターを含有する体細胞である、前記 (26) ~ (34) いずれか記載の選択方法、

(36) ECAT 遺伝子が ECAT1 遺伝子、ECAT2 遺伝子、ECAT3 遺伝子、ECAT4 遺伝子、ECAT5 遺伝子、ECAT6 遺伝子、ECAT7 遺伝子、ECAT8 遺伝子、ECAT9 遺伝子および Oct3/4 遺伝子から選択される 1 または 2 以上の遺伝子である、前記 (35) 記載の選択方法、

【0018】

(37) 前記 (21) ~ (25) いずれか記載の体細胞の、前記 (1) ~ (14) いずれか記載のスクリーニング方法または前記 (26) ~ (36) いずれか記載の選択方法における使用、

(38) 前記 (1) ~ (14) いずれか記載のスクリーニング方法において出現したマーカー遺伝子発現細胞または生存細胞、若しくは前記 (26) ~ (36) いずれか記載の選択方法において選択された ES 様細胞、

【0019】

(39) 以下の (a) および (b) の工程を含む、ES 細胞の未分化・多能性維持物質のスクリーニング方法：

(a) ECAT 遺伝子の発現調節領域により発現調節を受ける位置にマーカー遺伝子を存在させた遺伝子を含有する ES 細胞を、ES 細胞の未分化・多能性を維持できない培地中で被験物質と接触させる工程、

(b) 前記 (a) の工程の後、マーカー遺伝子発現細胞の存在の有無を調べ、該細胞を存在させた被験物質を ES 細胞未分化・多能性維持の候補物質として選択する工程、

(40) ECAT 遺伝子が、ECAT1 遺伝子、ECAT2 遺伝子、ECAT3 遺伝子、ECAT4 遺伝子、ECAT5 遺伝子、ECAT6 遺伝子、ECAT7 遺伝子、ECAT8 遺伝子、ECAT9 遺伝子および Oct3/4 遺伝子から選択される 1 または 2 以上の遺伝子である、前記 (39) 記載のスクリーニング方法、

(41) マーカー遺伝子が、薬剤耐性遺伝子、蛍光タンパク質遺伝子、発光酵素遺伝子、発色酵素遺伝子またはこれらの組み合わせに係る遺伝子である、前記 (39) または (40) 記載のスクリーニング方法、

(42) ES 細胞が、ECAT 遺伝子にマーカー遺伝子をノックインした遺伝子を含有する ES 細胞である、前記 (39) ~ (41) いずれか記載のスクリーニング方法、

(43) ES 細胞が、ECAT 遺伝子にマーカー遺伝子をノックインした遺伝子をホモで含有する ES 細胞である、前記 (42) 記載のスクリーニング方法、

(44) ECAT 遺伝子が ECAT1 遺伝子、ECAT2 遺伝子、ECAT3 遺伝子、ECAT4 遺伝子、ECAT5 遺伝子、ECAT6 遺伝子、ECAT7 遺伝子、ECAT8 遺伝子、ECAT9 遺伝子および Oct3/4 遺伝子から選択される 1 または 2 以上の遺伝子である、前記 (42) または (43) 記載のスクリーニング方法、

(45) 以下の (a) および (b) の工程を含む、前記 (39) 記載のスクリーニング方法：

(a) ECAT2 遺伝子に薬剤耐性遺伝子を含む遺伝子をノックインした遺伝子を含有する ES 細胞を、ES 細胞の未分化・多能性を維持できない培地中で被験物質と接触させる工程、

(b) 前記 (a) の工程の後、選択培地中での生存細胞の有無を調べ、該生存細胞を存在させた被験物質を ES 細胞未分化・多能性維持の候補物質として選択する工程、

(46) 以下の (a) および (b) の工程を含む、前記 (39) 記載のスクリーニング方法：

(a) ECAT3 遺伝子に薬剤耐性遺伝子を含む遺伝子をノックインした遺伝子を含有する ES 細胞を、ES 細胞の未分化・多能性を維持できない培地中で被験物質と接触させる工程、

(b) 前記 (a) の工程の後、選択培地中での生存細胞の有無を調べ、該生存細胞を存在させた被験物質を ES 細胞未分化・多能性維持の候補物質として選択する工程、

(47) 以下の (a) および (b) の工程を含む、前記 (39) 記載のスクリーニング方法、

(a) ECAT5 遺伝子に薬剤耐性遺伝子を含む遺伝子をノックインした遺伝子を含有する ES 細胞を、ES 細胞の未分化・多能性を維持できない培地中で被験物質と接触させる工程、

(b) 前記 (a) の工程の後、選択培地中での生存細胞の有無を調べ、該生存細胞を存在させた被験物質を ES 細胞未分化・多能性維持の候補物質として選択する工程、

(48) 以下の (a) および (b) の工程を含む、前記 (39) 記載のスクリーニング方法、

(a) ECAT2 遺伝子および ECAT3 遺伝子に、それぞれ薬剤耐性遺伝子を含む遺伝子をノックインした遺伝子を含有する ES 細胞を、ES 細胞の未分化・多能性を維持できない培地中で被験物質と接触させる工程、

(b) 前記 (a) の工程の後、選択培地中での生存細胞の有無を調べ、該生存細胞を存在させた被験物質を ES 細胞未分化・多能性維持の候補物質として選択する工程、

(49) ECAT2 遺伝子と ECAT3 遺伝子が、それぞれ異なる薬剤耐性遺伝子でノックインされている、前記 (48) 記載のスクリーニング方法、

(50) ES 細胞が、ECAT 遺伝子に薬剤耐性遺伝子を含む遺伝子をノックインした遺伝子をホモで含有する ES 細胞である、前記 (45) ~ (49) いずれか記載のスクリーニング方法、

(51) 以下の (a) および (b) の工程を含む、前記 (39) 記載のスクリーニング方法、

(a) ECAT4 遺伝子に薬剤耐性遺伝子を含む遺伝子をノックインした遺伝子を含有する ES 細胞を、ES 細胞の未分化・多能性を維持できない培地中で被験物質と接触させる工程、

(b) 前記 (a) の工程の後、選択培地中での生存細胞の有無を調べ、該生存細胞を存在させた被験物質を ES 細胞未分化・多能性維持の候補物質として選択する工程、

(52) ES 細胞が、ECAT 遺伝子に薬剤耐性遺伝子を含む遺伝子をノックインした遺伝子をヘテロで含有する ES 細胞である、前記 (51) 記載のスクリーニング方法、

【0020】

(53) 前記 (39) ~ (52) いずれか記載のスクリーニング方法を用いて選択される ES 細胞の未分化・多能性維持物質、

(54) フィーダー細胞の分泌産物である、前記 (53) 記載の ES 細胞の未分化・多能性維持物質、

(55) 血清由来成分である、前記 (53) 記載の ES 細胞の未分化・多能性維持物質、

【0021】

(56) ECAT 遺伝子にマーカー遺伝子をノックインした遺伝子を含有するノックインマウスの、前記 (39) ~ (52) いずれか記載のスクリーニング方法において用いる ES 細胞の供給源としての使用、

(57) ノックインマウスが、ECAT 遺伝子にマーカー遺伝子をノックインした遺伝子をホモで含有するノックインマウスである、前記 (56) 記載の使用、

(58) ECAT 遺伝子が ECAT1 遺伝子、ECAT2 遺伝子、ECAT3 遺伝子、ECAT4 遺伝子、ECAT5 遺伝子、ECAT6 遺伝子、ECAT7 遺伝子、ECAT8 遺伝子、ECAT9 遺伝子および Oct3/4 遺伝子から選択される 1 または 2 以上の遺伝子である、前記 (56) または (57) 記載の使用、

(59) マーカー遺伝子が、薬剤耐性遺伝子、蛍光タンパク質遺伝子、発光酵素遺伝子、発色酵素遺伝子またはこれらの組み合わせに係る遺伝子である、前記(56)～(58)いずれか記載の使用、

【0022】

(60) ECAT遺伝子の発現調節領域により発現調節を受ける位置にマーカー遺伝子を存在させた遺伝子を含有するES細胞、

(61) ECAT遺伝子がECAT1遺伝子、ECAT2遺伝子、ECAT3遺伝子、ECAT4遺伝子、ECAT5遺伝子、ECAT6遺伝子、ECAT7遺伝子、ECAT8遺伝子、ECAT9遺伝子およびOct3/4遺伝子から選択される1または2以上の遺伝子である、前記(60)記載のES細胞、

(62) マーカー遺伝子が、薬剤耐性遺伝子、蛍光タンパク質遺伝子、発光酵素遺伝子、発色酵素遺伝子またはこれらの組み合わせに係る遺伝子である、前記(60)または(61)記載のES細胞、

(63) ECAT遺伝子にマーカー遺伝子をノックインした遺伝子を含有する、前記(60)～(62)いずれか記載のES細胞、

(64) ECAT遺伝子にマーカー遺伝子をノックインした遺伝子をホモで含有する、前記(63)記載のES細胞、ならびに

(65) 前記(60)～(64)いずれか記載のES細胞の、前記(39)～(52)いずれか記載のスクリーニング方法における使用、に関する。

【発明の効果】

【0023】

本発明の体細胞核初期化物質のスクリーニング方法は、ES様細胞を効率良く選択できる方法であり、また体細胞の核初期化物質を効率的に同定できる方法である。核初期化物質は、幹細胞療法を現実化するために極めて重要な物質であり、本発明のスクリーニング方法により、そのような核初期化物質の早期発見が可能となる。さらに本発明のES細胞未分化・多能性維持物質のスクリーニング方法は、ES細胞未分化・多能性維持物質を効率的に同定できる方法である。当該物質はES細胞の臨床応用において極めて重要な物質であり、本発明のスクリーニング方法により、そのようなES細胞未分化・多能性維持物質の早期発見が可能となる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0024】

以下、本明細書において、アミノ酸、(ポリ)ペプチド、(ポリ)ヌクレオチドなどの略号による表示は、IUPAC-IUBの規定[IUPAC-IUB Communication on Biological Nomenclature, Eur. J. Biochem., 138: 9 (1984)]、「塩基配列又はアミノ酸配列を含む明細書等の作成のためのガイドライン」(日本国特許庁編)、および当該分野における慣用記号に従う。

【0025】

本明細書において「ECAT遺伝子(ES cell associated transcript gene)」とは、ES細胞等の分化全能性細胞で特異的に発現する遺伝子の総称である。具体的には、ECAT1遺伝子、ECAT2遺伝子、ECAT3遺伝子、ECAT4遺伝子、ECAT5遺伝子、ECAT6遺伝子、ECAT7遺伝子、ECAT8遺伝子、ECAT9遺伝子、Oct3/4遺伝子が挙げられる(WO 02/097090号公報)。本明細書において「ECAT遺伝子」という用語を用いる場合、技術内容に応じて、ECATのcDNA(mRNA)のみならず、ECATのゲノムDNAを指す場合もある。

これらECAT cDNAのマウス型・ヒト型の塩基配列およびアミノ酸配列についてはWO 02/097090号公報に記載されている。本明細書の配列表においては、以下の配列番号に示される。

【0026】

【表 1】

ECAT遺伝子	マウス型塩基配列	マウス型アミノ酸配列	ヒト型塩基配列	ヒト型アミノ酸配列
ECAT1	配列番号:1	配列番号:2	配列番号:3	配列番号:4
ECAT2	配列番号:5	配列番号:6	配列番号:7	配列番号:8
ECAT3	配列番号:9	配列番号:10	配列番号:11	配列番号:12
ECAT4	配列番号:13	配列番号:14	配列番号:15	配列番号:16
ECAT5	配列番号:17	配列番号:18	配列番号:19	配列番号:20
ECAT6	配列番号:21	配列番号:22		
ECAT7	配列番号:23	配列番号:24	配列番号:25	配列番号:26
ECAT8	配列番号:27	配列番号:28	配列番号:29	配列番号:30
ECAT9	配列番号:31	配列番号:32	配列番号:33	配列番号:34
Oct3/4	配列番号:35	配列番号:36	配列番号:37	配列番号:38

【0027】

「ECAT遺伝子」(ECAT1遺伝子、ECAT2遺伝子、ECAT3遺伝子、ECAT4遺伝子、ECAT5遺伝子、ECAT6遺伝子、ECAT7遺伝子、ECAT8遺伝子、ECAT9遺伝子およびOct3/4遺伝子)の範疇には、前記配列番号に示した塩基配列を含有する遺伝子のみならず、ES細胞に特異的に発現するという特徴を有する限り、これらの塩基配列に類似の塩基配列を含有する遺伝子も含まれる。

【0028】

ここで「類似の塩基配列を含有する遺伝子」とは、前記配列番号に示される塩基配列中、1若しくは複数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列を含有する遺伝子や、前記配列番号で示される塩基配列と高い相同性を有する塩基配列を含有する遺伝子が挙げられる。

ここで「高い相同性を有する塩基配列を含有する遺伝子」とは、各ECAT遺伝子とストリンジェントな条件でハイブリダイズする遺伝子を意味し、具体的には前記配列番号で示された塩基配列と70%以上、好ましくは80%以上、より好ましくは90%以上、特に好ましくは95%以上の相同性を有する塩基配列を含有する遺伝子が挙げられる。ここでストリンジェントな条件とは、ハイブリダイズ反応や洗浄の際の温度、塩濃度等を適宜変化させることにより調節することができ、所望の相同性に応じて設定されるが、例えば塩濃度:6×S SC、温度:65℃の条件が挙げられる。

【0029】

また「ECAT」(ECAT1、ECAT2、ECAT3、ECAT4、ECAT5、ECAT6、ECAT7、ECAT8、ECAT9およびOct3/4)の範疇には、前記配列番号に示したアミノ酸配列を含有するタンパク質のみならず、ES細胞に特異的に発現するという特徴を有する限り、これらのアミノ酸配列に類似のアミノ酸配列を含有するタンパク質も含まれる。

ここで「類似のアミノ酸配列を含有するタンパク質」とは、前記類似の塩基配列を含有する遺伝子によりコードされるタンパク質を指す。

【0030】

本発明のスクリーニング方法は、ECAT遺伝子の発現調節領域により発現調節を受ける位置にマーカー遺伝子を存在させた体細胞をスクリーニング用細胞として使用し、当該細胞に被験物質を接触させ、体細胞がES様細胞に変換されたことをマーカー遺伝子発現細胞の出現の有無でモニターすることにより、体細胞の核初期化物質(ES様細胞への変換物質)を効率的に同定する方法である。以下、本方法について具体的に説明する。

【0031】

(1)本発明の体細胞核初期化物質のスクリーニング方法

本発明は、以下の(a)および(b)の工程:

- (a) ECAT遺伝子の発現調節領域により発現調節を受ける位置にマーカー遺伝子を存在させた遺伝子を含有する体細胞と、被験物質とを接触させる工程、
(b) 前記(a)の工程の後、マーカー遺伝子発現細胞の出現の有無を調べ、該細胞を出現させた被験物質を体細胞の核初期化候補物質として選択する工程、
を含む、体細胞の核初期化物質のスクリーニング方法を提供する。

【0032】

前記で「ECAT遺伝子」とは、具体的には、ECAT1遺伝子、ECAT2遺伝子、ECAT3遺伝子、ECAT4遺伝子、ECAT5遺伝子、ECAT6遺伝子、ECAT7遺伝子、ECAT8遺伝子、ECAT9遺伝子およびOct3/4遺伝子から選択される1または2以上の遺伝子が挙げられる。ここで「1または2以上」とは、具体的には1または2～3個のECAT遺伝子の組み合わせが挙げられ、好ましくは1個のECAT遺伝子、または2個のECAT遺伝子の組み合わせが挙げられる。具体的にはECAT2遺伝子、ECAT3遺伝子、またはこれらECAT2遺伝子とECAT3遺伝子の組み合わせが例示される。

前記ECAT遺伝子は、マウス、ラット、ヒト、サル等如何なる種由来のECAT遺伝子であっても良いが、好ましくはマウス、ヒト由来のECAT遺伝子が挙げられる。

【0033】

前記で「マーカー遺伝子」とは、当該マーカー遺伝子を細胞に導入することにより、細胞の選別や選択を可能とするような遺伝子全般を指す。具体的には薬剤耐性遺伝子、蛍光タンパク質遺伝子、発光酵素遺伝子、発色酵素遺伝子またはこれらの組み合わせに係る遺伝子が挙げられる。

【0034】

薬剤耐性遺伝子としては、具体的にはネオマイシン耐性遺伝子(neo)、テトラサイクリン耐性遺伝子(tet)、カナマイシン耐性遺伝子、ゼオシン耐性遺伝子(zeo)、ハイグロマイシン耐性遺伝子(hygro)等が挙げられる。各薬剤を含有する培地(選択培地という)で細胞を培養することにより、薬剤耐性遺伝子が導入・発現した細胞のみが生き残る。従って、選択培地で細胞を培養することにより、薬剤耐性遺伝子を含有する細胞を容易に選択することができる。

【0035】

蛍光タンパク質遺伝子としては、具体的にはGFP(緑色蛍光タンパク質)遺伝子、YFP(黄色蛍光タンパク質)遺伝子、RFP(赤色蛍光タンパク質)遺伝子、エクオリン遺伝子等が挙げられる。これら蛍光タンパク質遺伝子が発現した細胞は、蛍光顕微鏡で検出することができる。また蛍光強度の違いを利用することによりセルソーター等で分離・選択することや、細胞を限界希釈して1ウエルあたり1細胞以下とした後に培養・増殖させ、蛍光を発する細胞(ウエル)を蛍光顕微鏡下で検出することにより当該細胞を選択することができる。さらに、軟寒天培地などの上でコロニーを形成させ、蛍光顕微鏡下などでコロニーを選択することもできる。

【0036】

発光酵素遺伝子としては、具体的にはルシフェラーゼ遺伝子等が挙げられる。これら発光酵素遺伝子を発現した細胞は、発光基質を加えて発光光度計で発光量を測定することにより検出することができる。また細胞を限界希釈して1ウエルあたり1細胞以下とした後に培養・増殖させ、各ウエルから一部の細胞を採取し、発光基質を加えて発光光度計で発光の如何を測定することにより当該細胞を選択することができる。

【0037】

発色酵素遺伝子としては、具体的には β ガラクトシダーゼ遺伝子、 β グルクロニダーゼ遺伝子、アルカリフォスファターゼ遺伝子、又は分泌型アルカリフォスファターゼであるSEAP遺伝子等が挙げられる。これら発色酵素遺伝子が発現した細胞は、発色基質を加えて発色の有無を観察することにより検出することができる。また細胞を限界希釈して1ウエルあたり1細胞以下とした後に培養・増殖させ、各ウエルから一部の細胞を採取し、発色基質を加えて発色の如何を観察することにより当該細胞を選択することができる。

【0038】

これらマーカー遺伝子の組み合わせに係る遺伝子としては、具体的にはネオマイシン耐性遺伝子 (neo) と β ガラクトシダーゼ遺伝子 (β -gal) との融合遺伝子である β geo 遺伝子が挙げられる。

【0039】

以上のようなマーカー遺伝子はいずれも当業者に周知であり、このようなマーカー遺伝子を含むベクターはインビトロジェン社、アマシャムバイオサイエンス社、プロメガ社、MBL(医学生物学研究所)等から市販されている。

【0040】

前記マーカー遺伝子のうち、細胞の選択が容易であるという観点から、特に好ましいのは薬剤耐性遺伝子、または当該薬剤耐性遺伝子を含む遺伝子である。

【0041】

前記において「体細胞」とは、ES細胞等の分化全能性細胞を除く全ての細胞を意味し、具体的には、(1) 神経幹細胞、造血幹細胞、間葉系幹細胞等の組織幹細胞(体性幹細胞)、(2) 組織前駆細胞、または(3) リンパ球、上皮細胞、筋肉細胞、線維芽細胞等の分化した細胞が挙げられる。

【0042】

本発明のスクリーニング方法においては、ECAT遺伝子の発現調節領域により発現調節を受ける位置にマーカー遺伝子を存在させた遺伝子を含む体細胞を、スクリーニング用細胞として用いる。

ここで「発現調節領域」とは、遺伝子の発現(転写)を調節する領域のことであり、「プロモーター領域」、若しくは「プロモーター及びエンハンサー領域」を含む領域を意味する。

ECAT遺伝子の発現調節領域により発現調節を受ける位置にマーカー遺伝子を存在させる方法は、いろいろ知られており、当業者に周知の如何なる方法を用いてマーカー遺伝子を存在させても良い。大別すると、(1-1) 個体(マウス)を利用してマーカー遺伝子を存在させる場合と、(1-2) 個体を利用せずに細胞レベルでマーカー遺伝子を存在させる場合がある。以下に詳述する。

【0043】

(1-1) 個体(マウス)を利用してマーカー遺伝子を存在させる方法

個体(マウス)を利用してマーカー遺伝子を存在させる場合は、ECAT遺伝子の発現調節領域により発現調節を受けるゲノム上の位置にマーカー遺伝子を存在させる。この場合、ECAT遺伝子自身は、発現可能な形で存在していても良く、またECAT遺伝子が破壊された形で存在していても良い。

遺伝子の発現調節領域は、通常エクソン1より上流域に存在する。従って、ECAT遺伝子の発現調節領域によりマーカー遺伝子が発現調節を受けるためには、当該マーカー遺伝子は、ECAT遺伝子のエクソン1より下流域に存在させることが望ましい。この場合、エクソン1より下流であれば、どのような位置に存在していても良い。

【0044】

(1-1-a) ECAT遺伝子を破壊する場合

ECAT遺伝子を破壊する方法は、当業者に周知の如何なる方法を用いても良いが、最も良く使われる手法としては、マーカー遺伝子を含む、かつECAT遺伝子の任意の位置で相同組換えを起こすベクター(以下ターゲッティングベクターと称する)を用いて、相同組換えにより当該ECAT遺伝子を標的破壊し、代わりにマーカー遺伝子をこの位置に存在させる方法が挙げられる。このようにECAT遺伝子を破壊し、その位置にマーカー遺伝子を存在させることを、「ECAT遺伝子にマーカー遺伝子をノックインする」と言う。

このようなマーカー遺伝子をノックインする方法は種々知られているが、中でもプロモータートラップ法が好適に用いられる。当該プロモータートラップ法は、プロモーターを持たないターゲッティングベクターを相同組換えによりゲノム中に挿入し、相同組換えが正しく起こった場合に内在性プロモーター(ECAT遺伝子プロモーター)によりマーカー遺伝子が発現するというものである。以下、当該プロモータートラップ法によりECAT遺伝子

発現調節領域により発現調節を受ける位置にマーカー遺伝子を存在させる方法につき具体例を示す。

【0045】

まず、ターゲッティングに必要な ECAT 遺伝子のゲノム配列を決定する。当該ゲノム配列は、例えば公的データベースである Mouse Genome Resources (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/guide/mouse/>) 等において既に公知である場合はこの配列情報を利用して配列決定することができる。また未知の場合は、配列番号：1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21、23、25、27、29、31、33、35 または 37 に記載の ECAT 遺伝子の一部をプライマーとして用い、当業者に入手可能なゲノムライブラリーを PCR 法等でスクリーニングすることにより、所望の ECAT 遺伝子のゲノム領域を含有するゲノミッククローンを単離することや、ゲノム塩基配列を決定することができる。ここで用いるゲノムライブラリーとしては、例えばマウス BAC (bacterial artificial chromosome) ライブラリー (Invitrogen) や PAC (P1-derived artificial chromosome) ライブラリー (Invitrogen) 等が挙げられる。

【0046】

次に、前記で同定した ECAT 遺伝子のゲノム DNA 配列に基づき、マーカー遺伝子と置き換える ECAT 遺伝子ゲノム領域を決定する（以下、ECAT ゲノム領域 A と称する）。この ECAT ゲノム領域 A を挟む 5' 側領域（5' アーム）と 3' 側領域（3' アーム）を、ゲノム DNA を鋳型として PCR を行うことなどにより増幅する。ここで鋳型となるゲノム DNA としては、ECAT 遺伝子を含有するマウス BAC クローンのゲノム DNA 等が挙げられる。PCR のプライマーは前記 ECAT 遺伝子ゲノム DNA の配列に基づき設計することができる。増幅した 5' アームおよび 3' アームを、プロモータートラップ用ターゲッティングベクターのマーカー遺伝子カセットを挟む両側に挿入する。ここで用いるプロモータートラップ用ターゲッティングベクターとしては、例えば IRES (internal ribosome entry site)- β geo (β ガラクトシダーゼとネオマイシン耐性遺伝子の融合遺伝子) カセット (Mountford P. et al., Proc. Natl. Sci. USA, 91:4303-4307 (1994)) を含有する pBSSK(-)-IRES- β geo や、IRES-Hygro (ハイグロマイシン耐性遺伝子) カセットを含有する同様のベクターなどを挙げるることができる。ここで IRES-Hygro カセットは、前記 IRES- β geo カセットの β geo 部分を Hygro (Invitrogen) に置き換えることなどにより作製することができる。

次に作製されたターゲッティングベクターを制限酵素で消化して直鎖化し、これをエレクトロポレーション等により ES 細胞に導入する。

【0047】

導入に用いる ES 細胞としては、たとえば RF8 細胞 (Meiner, V. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93: 14041-14046 (1996))、JI 細胞 (Li, E. et al., Cell, 69:915-926 (1992))、CGR8 細胞 (Nichols, J. et al., Development, 110:1341-1348 (1990))、MG1.19 細胞 (Gassman, M. et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 92:1292-1296 (1995)) や、市販されているマウス ES 細胞 129SV (No. R-CMTI-1-15, R-CMTI-1A)、マウス ES 細胞 C57/BL6 (No. R-CMTI-2A)、マウス ES 細胞 DBA-1 (No. R-CMTI-3A) (以上大日本製薬) 等の ES 細胞が挙げられる。

【0048】

ターゲッティングベクターの ES 細胞への導入は、エレクトロポレーション (Meiner, V. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93: 14041-14046 (1996) 等参照)、リン酸カルシウム法、DEAE-デキストラン法、エレクトロポレーション法、遺伝子導入用リピッド (Lipofectamine, Lipofectin; Invitrogen) を用いる方法などにより行われる。その後当該ターゲッティングベクターが導入された ES 細胞を、用いたマーカー遺伝子（例えば薬剤耐性遺伝子）の特性に基づき選択する。選択された ES 細胞において正しく相同組み換えが起こっていることは ECAT 遺伝子の一部をプローブとして用いたサザンブロット等により確認することができる。以上のようにして ECAT ゲノム遺伝子にマーカー遺伝子をノックインした遺伝子をヘテロで含有する ES 細胞を作製することができる。

【0049】

ES 細胞の培養には、当業者に知られた如何なる培地を用いても良い。例えば RF8 細胞の場合、以下の組成：15% FBS、0.1mM Non Essential Amino Acids (GIBCO BRL)、2mM L-gl

utamine、50U/mlペニシリン-ストレプトマイシン、0.11mM 2-ME(GIBCO BRL)/Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)の培地等が挙げられる。また市販の調製済み培地(例えば大日本製薬No.R-ES-101等)を用いることもできる。

【0050】

ES細胞の培養においてフィーダー細胞を用いる場合、当該フィーダー細胞は、マウス胚から常法により調製した繊維芽細胞や繊維芽細胞由来のSTO細胞株(Meiner, V. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93: 14041-14046(1996))を用いても良く、また市販品を用いても良い。市販品としては、例えばPMEF-N、PMEF-NL、PMEF-H、PMEF-HL(以上大日本製薬)などのフィーダー細胞が挙げられる。フィーダー細胞は、マイトマイシンC処理することにより増殖を停止させた後にES細胞の培養に用いることが望ましい。

また、ES細胞の培養において前記フィーダー細胞を用いない場合は、LIF(Leukemia Inhibitory Factor)を添加して培養を行うことができる。LIFとしてはマウス組み換えLIF、ラット組み換えLIF(ケミコン社等)などが用いられる。

【0051】

次に、前記ターゲッティングベクターを含有するES細胞をマウスに導入してノックアウトマウス(マーカー遺伝子ノックインマウス)を作製する。当該マーカー遺伝子ノックインマウスの作製方法は当業者に周知である。具体的には、前記ES細胞をマウス(例えばC57BL/6等)の胚盤胞(blastocyst)にインジェクトし、偽妊娠させたメスのマウス(ICR等)の子宮内に移植することによりキメラマウスを作製する。その後キメラマウスと通常のマウス(C57BL/6等)とを交配させ、マーカー遺伝子がヘテロでノックインされたヘテロ変異マウスを作製する。ヘテロ変異マウス同士を交配させることにより、マーカー遺伝子がホモでノックインされたホモ変異マウスが得られる。

【0052】

本発明のスクリーニングで用いる体細胞は、前記ヘテロ変異マウスから単離された体細胞であっても、またホモ変異マウスから単離された体細胞であっても良い。しかしながら、本発明のスクリーニングにおける体細胞からES様細胞への変換ステップ、およびES様細胞の維持を可能とするために、ES細胞の維持に必須のECAT遺伝子をノックアウトした場合は、ヘテロ変異マウス由来の体細胞を用いる必要がある。当該ES細胞の維持に必須のECAT遺伝子としては、具体的にはECAT4遺伝子(Mitsui, K., et al., Cell, 113: 631-642(2003))が挙げられる。一方、ES細胞の維持に必須でないECAT遺伝子をノックアウトする場合は、ヘテロ変異マウス由来の体細胞を用いても、ホモ変異マウス由来の体細胞を用いても良い。当該ES細胞の維持に必須でないECAT遺伝子としては、ECAT2遺伝子、ECAT3遺伝子、ECAT5遺伝子が挙げられる。すなわちECAT3遺伝子に関しては文献(Tokuzawa, Y., et al., Molecular and Cellular Biology, 23(8): 2699-2708(2003))に示されるように、ECAT5遺伝子に関しては文献(Takahashi, K., et al., Nature, 423: 541-545(2003))に示されるように、またECAT2遺伝子については後述の実施例において初めて明らかにされたように、これらのECATはES細胞の維持に影響を与えない因子である。このうちECAT2遺伝子およびECAT3遺伝子はES細胞の維持だけでなく増殖にも影響を与えないため、ホモ変異マウス由来の体細胞を用いる場合は、ECAT2遺伝子またはECAT3遺伝子にマーカー遺伝子をノックインしたホモ変異ノックインマウス由来の体細胞を利用することが好ましい。

【0053】

ECAT遺伝子にマーカー遺伝子をノックインした遺伝子をホモで含有することにより、ヘテロで含有した場合と比較して、マーカー遺伝子が2倍発現していることになるので、マーカー発現細胞の選択が正確かつ容易になるという利点がある。この観点からECAT2遺伝子およびECAT3遺伝子は非常に有用なターゲットである。

【0054】

さらに、異なるECAT遺伝子のホモ変異マウス同士を交配させることにより、ダブルノックインマウスを作製することができる。例えばECAT2遺伝子のホモ変異マウスと、ECAT3遺伝子のホモ変異マウスを交配させることにより、ECAT2遺伝子とECAT3遺伝子の両方がマーカー遺伝子に置き換えられたダブルノックインマウスを作製することができる。その際、

各ECAT遺伝子には、それぞれ異なるマーカー遺伝子がノックインされていることが好ましい。この場合、2つの異なるマーカー遺伝子（例えばネオマイシン耐性遺伝子とハイグロマイシン耐性遺伝子）により二重に選択することが可能となるため、本発明のスクリーニングにおいて擬陽性のES様細胞を選択する可能性が減少し、スクリーニングの成功確度が格段に向上できる。

【0055】

具体的には、ECAT2遺伝子とECAT3遺伝子がマーカー遺伝子に置き換えられたダブルノックインマウス、ECAT2遺伝子とECAT4遺伝子がマーカー遺伝子に置き換えられたダブルノックインマウス、ECAT2遺伝子とECAT5遺伝子がマーカー遺伝子に置き換えられたダブルノックインマウス、ECAT3遺伝子とECAT4遺伝子がマーカー遺伝子に置き換えられたダブルノックインマウス、ECAT3遺伝子とECAT5遺伝子がマーカー遺伝子に置き換えられたダブルノックインマウス、ECAT4遺伝子とECAT5遺伝子がマーカー遺伝子に置き換えられたダブルノックインマウス、に由来する体細胞が例示される。好ましくはECAT2遺伝子とECAT3遺伝子がホモでマーカー遺伝子に置き換えられたダブルノックインマウス由来の体細胞が挙げられる。

【0056】

(1-1-b) ECAT遺伝子を破壊しない場合

ECAT遺伝子を破壊することなく、ECAT遺伝子の発現調節領域により発現調節を受ける位置にマーカー遺伝子を存在させる手法としては、当該ECAT遺伝子の発現調節領域により発現調節を受ける位置にマーカー遺伝子を存在させたBACベクターまたはPACベクター等を、マウスやラット等の個体に導入して作製したトランスジェニック非ヒト動物を利用する手法が挙げられる。以下BACベクターを例にとり説明する。

ここで用いるECAT遺伝子の発現調節領域を含有するBACクローンは、前記(1-1-a)に記述したように、ECAT遺伝子の配列情報に基づき単離・同定することができる。ECAT遺伝子含有BACクローンにおいて、ECAT遺伝子の一部をマーカー遺伝子に置き換えるには、例えばRed/ET Recombination(Gene Bridges)を用いて容易に行うことができる。各ECAT遺伝子の発現調節領域は、通常、ECAT遺伝子のエクソン1より上流域に存在する。従って、ECAT遺伝子の発現調節領域によりマーカー遺伝子が発現調節を受けるためには、当該マーカー遺伝子は、ECAT遺伝子のエクソン1より下流域に存在させることが望ましい。この場合、エクソン1より下流であれば、ECAT遺伝子上のどのような位置にマーカー遺伝子を存在させても良い。

【0057】

以上のようにして作製されたECAT遺伝子の発現調節領域により発現調節を受ける位置にマーカー遺伝子を存在させたBACベクター（以下、マーカー遺伝子含有BACベクターと称することがある）を導入したトランスジェニック動物を作製する方法は周知であり、例えば実験医学別冊「新遺伝子工学ハンドブック改訂第3版」（羊土社、1999年）等に基づき作製することができる。以下、マウスを例にとりトランスジェニック動物の作製につき説明する。

マウス受精卵への遺伝子の導入方法は特に限定されるものではなく、マイクロインジェクション法やエレクトロポレーション法等により導入することができる。導入後、得られた卵細胞を培養し、仮親マウスの輸卵管に移植し、その後被移植マウスを飼育し、生まれた仔マウスから所望の仔マウスを選択する。当該選択は、例えば仔マウス由来のDNAをドットプロットハイブリダイゼーション法やPCR法で導入遺伝子の可否を調べることにより行うことができる。

前記仔マウスと野生型マウスとを交配させ、ヘテロトランスジェニックマウス（導入遺伝子をヘテロで含有するマウス）を作製する。ヘテロマウス同士を交配させることにより、マーカー遺伝子含有BACベクターをホモで含有するトランスジェニックマウスを得ることができる。

【0058】

本発明のスクリーニングで用いる体細胞は、前記ヘテロトランスジェニックマウスから

単離された体細胞であっても、またホモトランスジェニックマウスから単離された体細胞であっても良い。本トランスジェニックマウスにおいてはECAT遺伝子自身が発現しているため、前記ノックインマウスの場合と異なり、用いたECAT遺伝子がES細胞の維持に必須の遺伝子であるか否かを考慮する必要はない。よって、いずれのECAT遺伝子（ECAT1遺伝子、ECAT2遺伝子、ECAT3遺伝子、ECAT4遺伝子、ECAT5遺伝子、ECAT6遺伝子、ECAT7遺伝子、ECAT8遺伝子、ECAT9遺伝子およびOct3/4遺伝子）についても等しく用いることができ、マーカ遺伝子発現量が多いという観点から、マーカ遺伝子をホモで含有するトランスジェニックマウスを利用することが好ましい。

【0059】

さらに、異なるECAT遺伝子のトランスジェニックマウス同士を交配させることにより、ダブルトランスジェニックマウスを作製することができる。その際、交配させる各トランスジェニックマウスは、それぞれ異なるマーカ遺伝子を含有していることが好ましい。この場合、2つの異なるマーカ遺伝子（例えばネオマイシン耐性遺伝子とハイグロマイシン耐性遺伝子）により二重に選択することが可能となるため、本発明のスクリーニングにおいて擬陽性のES様細胞を選択する可能性が減少し、スクリーニングの成功確度が格段に向上できる。

【0060】

以上のノックインマウスまたはトランスジェニックマウスから単離する体細胞は、如何なる体細胞であっても良いが、その後のスクリーニングにおける取り扱いの容易さから、例えばリンパ球、皮膚細胞、繊維芽細胞などが挙げられる。これらの細胞は当業者に周知の手法にて単離することができる。

【0061】

以上のように、ECAT遺伝子にマーカ遺伝子をノックインした体細胞、またはマーカ遺伝子を導入した体細胞を、個体（マウス）レベルで維持することにより、あらゆる組織から、いつでも容易に体細胞を調製することが可能となるため、前記手法は非常に好ましい体細胞の供給方法である。

【0062】

(1-2) 個体を利用せずに細胞レベルでマーカ遺伝子を存在させる方法

個体を利用せずに、細胞内において、ECAT遺伝子発現調節領域により発現調節を受ける位置にマーカ遺伝子を存在させる方法はいろいろ知られており、当業者に周知の如何なる方法を用いてマーカ遺伝子を存在させても良い。一般的には、マーカ遺伝子を含有するベクターを細胞に導入する方法が挙げられる。

【0063】

遺伝子導入に用いられる細胞は、体細胞であってもES細胞であっても良い。ここで用いる体細胞としては、マウス、ヒト、サル等の如何なる種に由来する体細胞であっても良い。当該体細胞は初代培養細胞であっても株化細胞であっても良く、具体的には、胎児繊維芽細胞（MEF）、骨髓由来間葉系幹細胞等の初代培養細胞や、NIH3T3のような株化細胞などが挙げられる。またES細胞としては、前記に挙げたマウスES細胞の他、ヒトやサルのES細胞も用いることができる。ここでヒトES細胞としては、KhES-1、KhES-2あるいはKhES-3（以上、京大再生研付属幹細胞医学研究センター）などが挙げられ、またサルES細胞としてはカニクイザルES細胞（旭テクノグラス）を挙げることができる。

【0064】

細胞へのベクターの導入方法としては、前記宿主細胞に適合した通常の導入方法を用いれば良い。具体的にはリン酸カルシウム法、DEAE-デキストラン法、エレクトロポレーション法、遺伝子導入用リピッド（Lipofectamine、Lipofectin; Invitrogen）を用いる方法などが挙げられる。

【0065】

導入に用いるベクターとしては、約300kbのDNAまでクローニング可能なベクターであるBACベクターやPACベクター、プラスミドベクター、さらには前記(1-1)に記載したターゲットインジェクションベクターなどが挙げられる。以下これら各ベクターを用いてECAT遺伝子の発現

調節領域により発現調節を受ける位置にマーカー遺伝子を存在させた体細胞を作製する方法について記載する。

【0066】

(1-2-a) BACベクター、PACベクターを用いる場合

ECAT遺伝子の発現調節領域を含有するBACベクターやPACベクターを利用することにより、ECAT遺伝子発現調節領域により発現調節を受ける位置にマーカー遺伝子を存在させることができる。以下BACベクターを例にとり説明する。

ここで用いるECAT遺伝子の発現調節領域を含有するBACクローン（以下ECAT遺伝子含有BACクローンと称する）は、前記(1-1)に記述したように、ECAT遺伝子の配列情報に基づき単離・同定することができる。ECAT遺伝子含有BACクローンにおいて、ECAT遺伝子の一部をマーカー遺伝子に置き換えるには、例えば Red/ET Recombination(Gene Bridges)を用いて容易に行うことができる。各ECAT遺伝子の発現調節領域は、通常、ECAT遺伝子のエクソン1より上流域に存在する。従って、ECAT遺伝子の発現調節領域によりマーカー遺伝子が発現調節を受けるためには、当該マーカー遺伝子は、ECAT遺伝子のエクソン1より下流域に存在させることが望ましい。この場合、エクソン1より下流であれば、ECAT遺伝子上のどのような位置にマーカー遺伝子を存在させても良い。

【0067】

以上のようにして作製されたECAT遺伝子の発現調節領域により発現調節を受ける位置にマーカー遺伝子を存在させたBACベクターを体細胞に導入することにより、本発明のスクリーニング用の体細胞とすることができる。ここで導入するBACベクターは1種類であっても、異なるECAT遺伝子を含有する2種類以上のBACベクターであっても良い。なお、当該BACベクター導入細胞を選択培地中で容易に選択できるように、BACベクター中に薬剤耐性遺伝子を含む遺伝子（以下第2の薬剤耐性遺伝子と称する）が挿入されていることが好ましい。この場合、体細胞での発現を可能とするために、当該第2の薬剤耐性遺伝子の5'側または3'側に体細胞で発現するプロモーターが付加されている必要がある。また当該第2の薬剤耐性遺伝子は、ECAT遺伝子の発現調節領域により発現調節を受ける位置に存在するマーカー遺伝子と同じ種類の薬剤耐性遺伝子であっても良く、異なる種類の薬剤耐性遺伝子であっても良いが、異なる種類の薬剤耐性遺伝子であることが望ましい。前記で同じ種類の薬剤耐性遺伝子を用いた場合は、第2の薬剤耐性遺伝子の両側にloxP配列またはFRT配列を付加しておき、BACベクター導入細胞を選択培地中で選択した後に、リコンビナーゼCreまたはFLPにより第2の薬剤耐性遺伝子を切り出すことができる。

前記と異なり、BACベクター中に第2の薬剤耐性遺伝子を挿入しない場合は、当該第2の薬剤耐性遺伝子を含有する第2の発現ベクターを、前記BACベクターと共に共導入(co-transfection)し、選択培地で選択しても良い。その場合、第2の発現ベクターよりもBACベクターを大過剰に用いて導入を行うことが望ましい。

【0068】

前記ECAT遺伝子の発現調節領域により発現調節を受ける位置にマーカー遺伝子を存在させたBACベクターをES細胞に導入した場合は、用いたマーカー遺伝子の性質に基づき、マーカー遺伝子が導入・発現しているES細胞を選択することができる。その後、当該ES細胞を体細胞に分化させることにより、本発明のスクリーニングに用いる体細胞とすることができる。ES細胞はフィーダー細胞の存在しない培養条件下で分化するため、このような条件下で分化させて得られた体細胞や、レチノイン酸等の当業者に知られた分化誘導剤で分化させて得られた体細胞を、本発明のスクリーニングに用いることができる。ここでES細胞から分化させた体細胞としては、例えば組織幹細胞、組織前駆細胞、または体細胞（神経細胞、皮膚角質細胞、心筋細胞、骨格筋細胞、血液細胞、脾臓細胞または色素細胞など）が挙げられる。

【0069】

(1-2-b) プロモーターを有さないプラスミドベクターを用いる場合

ECAT遺伝子の発現調節領域とマーカー遺伝子との融合遺伝子を、プロモーターを有さないプラスミドベクターに挿入し、細胞を形質転換することにより、本発明のスクリーニン

グ用の細胞を作製することができる。

ここで用いるベクターとしては、例えば pBluescript(Stratagene)、pCR2.1(Invitrogen)といったプロモーターを有さないプラスミドベクターが挙げられる。

ここで用いるECAT遺伝子の発現調節領域は、例えば該遺伝子の転写開始部位上流約1 kb、好ましくは約2kbが挙げられる。

【0070】

各ECAT遺伝子の発現調節領域は、例えば(i)5'-RACE法(例えば、5' full Race Core Kit(宝酒造社製)等を用いて実施される)、オリゴキャップ法、S1プライマーマッピング等の通常の方法により5'末端を決定するステップ；(ii)Genome Walker Kit(クローンテック社製)等を用いて5'-上流領域を取得し、得られた上流領域について、プロモーター活性を測定するステップ；を含む手法等により同定することができる。このようにして同定したECAT遺伝子発現調節領域の3'側にマーカー遺伝子を融合し、これを前記プラスミドベクターに挿入することにより、ECAT遺伝子の発現調節領域により発現調節を受ける位置にマーカー遺伝子を存在させたプラスミドベクターを作製することができる。

以上のようにして作製したベクターを、前記(1-2-a)と同様にして体細胞やES細胞に導入することにより、本発明のスクリーニング用体細胞を作製することができる。

【0071】

(1-2-c)ターゲッティングベクターを用いる場合

前記(1-1)に記載したターゲッティングベクターを体細胞若しくはES細胞に導入することによっても、本発明のスクリーニング用体細胞を作製することができる。

前記ターゲッティングベクターを体細胞に導入する場合は、ベクター導入細胞を選択培地中で容易に選択できるように、前記(1-2-a)と同様に薬剤耐性遺伝子を含む遺伝子(第2の薬剤耐性遺伝子)をターゲッティングベクター上に存在させるか、またはターゲッティングベクターと共に第2の薬剤耐性遺伝子を含有する第2の発現ベクターを共導入(co-transfection)し、選択培地で選択して得られた体細胞を本発明のスクリーニングに用いることがより好ましい。その場合、第2の発現ベクターよりも前記ターゲッティングベクターを大過剰に用いて導入を行うことが望ましい。

【0072】

前記体細胞は、ECAT遺伝子にマーカー遺伝子をノックインした遺伝子をヘテロで含有していても良く、またホモで含有していても良い。前述のようにECAT4遺伝子を利用する場合は前記ノックイン遺伝子をヘテロで含有することが望ましく、またECAT2遺伝子、ECAT3遺伝子およびECAT5遺伝子(特にECAT2遺伝子、ECAT3遺伝子)を利用する場合は、前記ノックイン遺伝子をホモで含有することが望ましい。ECAT遺伝子にマーカー遺伝子をノックインした遺伝子をホモで含有する体細胞は、ノックイン遺伝子をヘテロで含有する体細胞に、さらにノックイン遺伝子(マーカー遺伝子を含有するターゲッティングベクター)を導入することにより作製することができる。またノックイン遺伝子をヘテロで含有する体細胞を高濃度の薬剤を含む選択培地で培養することによっても、選択することができる。

さらに、前記ノックイン遺伝子をホモで含有する体細胞に対して別のノックイン遺伝子(別のECAT遺伝子がノックアウトされた遺伝子)を導入することにより、前記(1-1)と同様のダブルノックイン細胞を作製することができる。

【0073】

前記ターゲッティングベクターをES細胞に導入する場合は、ターゲッティングベクター上のマーカー遺伝子の性質に基づいて、マーカー遺伝子導入・発現細胞を選択することができる。当該ES細胞も、前記体細胞と同様、ECAT遺伝子にマーカー遺伝子をノックインした遺伝子をヘテロで含有していても良く、またホモで含有していても良い。ホモ変異細胞の作製法としては、後述の実施例3に記載のECAT2遺伝子ホモ変異ES細胞の作製法を参照されたい。なお、ES細胞から体細胞への誘導方法は、前記(1-2-a)と同様である。

【0074】

本発明のスクリーニング工程(a)においては、以上のようにして作製した体細胞と、被験物質とを接触させる。

ここで用いられる被験物質は、制限されないが、核酸、ペプチド、タンパク質、有機化合物、無機化合物などであり、本発明のスクリーニングは、具体的にはこれらの被験物質またはこれらを含む試料（被験試料）を前記体細胞と接触させることにより行われる。かかる被験試料としては、細胞抽出液、遺伝子（ゲノム、cDNA）ライブラリー、RNAiライブラリー、アンチセンス核酸、合成低分子化合物、合成ペプチド、天然化合物などが挙げられる。具体的には、実施例に示したES細胞、またはES細胞の抽出液（抽出画分）、ES細胞由来のcDNAライブラリーまたはゲノムライブラリー、増殖因子などが挙げられる。

これら被験試料は、体細胞への取り込み可能な形態で体細胞と接触させる。例えば被験試料が核酸（cDNAライブラリー等）の場合は、リン酸カルシウム、DEAE-デキストランや遺伝子導入用リピッドを用いて体細胞に導入する。

【0075】

体細胞と被験物質とを接触させる条件は、該細胞が死滅せず且つ被験物質が取り込まれるのに適した培養条件（温度、pH、培地組成など）であれば特に制限はない。

前記体細胞と被験物質との接触の前に、接触の際に、若しくは接触後に、ES細胞の培養条件で細胞培養を行う。ES細胞の培養は、当業者に知られた如何なる方法を用いても良い。例えばRF8細胞の場合、以下の組成：15%FBS、0.1mM Non Essential Amino Acids (GIBCO BRL)、2mM L-glutamine、50U/mlペニシリン-ストレプトマイシン、0.11mM 2-ME(GIBCO BRL)/Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)の培地等が挙げられる。また市販の調製済み培地（例えば大日本製薬No.R-ES-101等）を用いることもできる。

【0076】

ES細胞の培養においてフィーダー細胞を用いる場合、当該フィーダー細胞は、マウス胚から常法により調製した繊維芽細胞や繊維芽細胞由来のSTO細胞株（Meiner, V. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93: 14041-14046(1996)）を用いても良く、また市販品を用いても良い。市販品としては、例えば PMEF-N、PMEF-NL、PMEF-H、PMEF-HL（以上大日本製薬）などのフィーダー細胞が挙げられる。フィーダー細胞は、マイトマイシンC処理することにより増殖を停止させた後にES細胞の培養に用いることが望ましい。

また、ES細胞の培養において前記フィーダー細胞を用いない場合は、LIF（Leukemia Inhibitory Factor）を添加して培養を行うことができる。LIFとしてはマウス組み換えLIF、ラット組み換えLIF（ケミコン社等）などが挙げられる。

前記ES細胞の培養条件における培養日数は、細胞の状態等により適宜変更できるが、1日～3日程度が好ましい。

【0077】

マーカー遺伝子として薬剤耐性遺伝子を含む遺伝子を用いた場合は、対応する薬剤を含む培地（選択培地）で選択を行う。当該薬剤は、体細胞と被験物質との接触の際に培地に含まれていても良く、また接触後に含ませても良い。さらに、ES細胞の培養条件で培養した後に前記薬剤を培地に含ませても良い。

【0078】

前記工程の後、マーカー遺伝子発現細胞の出現の有無を調べ、該細胞を出現させた被験物質を体細胞の核初期化物質の候補物質として選択する（工程(b)）。以下当該工程(b)について記述する。

【0079】

マーカー遺伝子が薬剤耐性遺伝子を含む遺伝子の場合は、前記のように選択培地で培養することによりマーカー遺伝子発現細胞を選択することができる。またマーカー遺伝子が蛍光タンパク質遺伝子の場合は蛍光顕微鏡で観察することによって、発光酵素遺伝子の場合は発光基質を加えることによって、また発色酵素遺伝子の場合は発色基質を加えることによって、マーカー遺伝子発現細胞を検出することができる。

マーカー遺伝子発現細胞が認められた場合、ここで用いた被験試料（被験物質）を、体細胞の核初期化物質の候補物質として選択する。

前記スクリーニングは、必要に応じて何度でも繰り返し行うことができる。例えば1回目のスクリーニングでcDNAライブラリーや細胞抽出物といった混合物を用いた場合、2回

目以降は、さらに当該混合物を細分化（分画）して同様のスクリーニングを繰り返し行うことにより、最終的に、体細胞核初期化因子の候補物質を選択することができる。

【0080】

以下、前記本発明のスクリーニング方法の具体例として、ECAT2遺伝子、ECAT3遺伝子、ECAT4遺伝子およびECAT5遺伝子を利用した本発明のスクリーニング方法につき例示するが、いずれのECAT遺伝子（ECAT1遺伝子、ECAT2遺伝子、ECAT3遺伝子、ECAT4遺伝子、ECAT5遺伝子、ECAT6遺伝子、ECAT7遺伝子、ECAT8遺伝子、ECAT9遺伝子およびOct3/4遺伝子）についても以下を参考にして同様のスクリーニングを実施することができる。

【0081】

例1：ECAT2遺伝子を利用したスクリーニング

ECAT2遺伝子を利用した本発明のスクリーニング方法の具体例として、以下(a)及び(b)

- ：
- (a) ECAT2遺伝子に薬剤耐性遺伝子を含む遺伝子をノックインした遺伝子を含有する体細胞と、被験物質とを接触させる工程、
 - (b) 前記(a)の工程の後、選択培地中での生存細胞の有無を調べ、該生存細胞を生じさせた被験物質を体細胞の核初期化候補物質として選択する工程、
- を含むスクリーニング方法が例示される。

【0082】

後述の実施例に示したように、ECAT2遺伝子はES細胞の維持・増殖に必須の因子ではない。従って、ECAT2遺伝子にマーカー遺伝子をホモでノックインした体細胞を用いて本発明のスクリーニングを行ことが好ましい。

ECAT2遺伝子にマーカー遺伝子をホモでノックインしたノックインマウス（ECAT2 ^{β geo/ β geo}マウス）は、例えば後述の実施例3に記載の方法で作製することができる。このECAT2 ^{β geo/ β geo}マウスからリンパ球、皮膚細胞などの体細胞を単離する。この体細胞に対して被験物質を添加し、ES細胞の培養条件（例えばMeiner, V.L., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, 93(24): p14041-14046(1996)を参照）でフィーダー細胞上で細胞培養し、G418(0.25mg/ml)で選択を行う。G418による選択で生存細胞が認められた場合、ここで用いた被験物質を、体細胞の核初期化物質の候補物質として選択する。

【0083】

例えば被験物質としてES細胞由来のcDNAライブラリーを用いる場合は、前記体細胞に対してリポフェクチン法等の公知の手法でcDNAライブラリー由来のcDNAプールをトランスフェクトし、前記手法にてG418で選択を行い、生存細胞の有無を確認する。生存細胞が確認された場合、そのcDNAプールをさらに幾つかのプールに分けて体細胞にトランスフェクトする。この実験を繰り返すことにより、最終的に、ES細胞由来の体細胞核初期化（候補）因子を選択することができる。

【0084】

例2：ECAT3遺伝子を利用したスクリーニング

ECAT3遺伝子を利用した本発明のスクリーニング方法の具体例として、以下(a)及び(b)

- ：
- (a) ECAT3遺伝子に薬剤耐性遺伝子を含む遺伝子をノックインした遺伝子を含有する体細胞と、被験物質とを接触させる工程、
 - (b) 前記(a)の工程の後、選択培地中での生存細胞の有無を調べ、該生存細胞を生じさせた被験物質を体細胞の核初期化候補物質として選択する工程、
- を含むスクリーニング方法が例示される。

【0085】

後述の実施例に示したように、ECAT3遺伝子はES細胞の維持・増殖に必須の因子ではない。従って、ECAT3遺伝子にマーカー遺伝子をホモでノックインした体細胞を用いて本発明のスクリーニングを行ことが好ましい。

ECAT3遺伝子にマーカー遺伝子をホモでノックインしたノックインマウス（ECAT3 ^{β geo/ β geo}マウス）は、例えば後述の実施例1に記載の方法で作製することができる。このECA

T3 ^{β geo/ β geo}マウスからリンパ球、皮膚細胞などの体細胞を単離する。この体細胞に対して被験物質を添加し、ES細胞の培養条件（例えばMeiner, V.L., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, 93(24): p14041-14046(1996)を参照）でフィーダー細胞上で細胞培養し、G418 (0.25mg/ml) で選択を行う。G418による選択で生存細胞が認められた場合、ここで用いた被験物質を、体細胞の核初期化物質の候補物質として選択する。

【0086】

例えば被験物質としてES細胞由来のcDNAライブラリーを用いる場合は、前記体細胞に対してリポフェクチン法等の公知の手法でcDNAライブラリー由来のcDNAプールをトランスフェクトし、前記手法にてG418で選択を行い、生存細胞の有無を確認する。生存細胞が確認された場合、そのcDNAプールをさらに幾つかのプールに分けて体細胞にトランスフェクトする。この実験を繰り返すことにより、最終的に、ES細胞由来の体細胞核初期化(候補)因子を選択することができる。

【0087】

例3: ECAT4遺伝子を利用したスクリーニング

ECAT4遺伝子を利用した本発明のスクリーニング方法の具体例として、以下(a)及び(b)

- ：
- (a) ECAT4遺伝子に薬剤耐性遺伝子を含む遺伝子をノックインした遺伝子を含有する体細胞と、被験物質とを接触させる工程、
 - (b) 前記(a)の工程の後、選択培地中での生存細胞の有無を調べ、該生存細胞を生じさせた被験物質を体細胞の核初期化候補物質として選択する工程、
- を含むスクリーニング方法が例示される。

【0088】

ECAT4遺伝子はES細胞の維持・増殖に必須の因子である。従って、ECAT4遺伝子にマーカー遺伝子をヘテロでノックインした体細胞を用いて本発明のスクリーニングを行う。

ECAT4遺伝子にマーカー遺伝子をヘテロでノックインしたノックインマウス (ECAT4 ^{β geo^{0/+}}マウス) の作製は、文献 (Mitsui, K., et al., Cell, 113: 631-642(2003)) に記載の方法等で作製することができるが、簡単に述べると以下の方法が例示される。

【0089】

マウスECAT4遺伝子のエクソン2を、IRES- β geoカセット (Mountford et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91:4303-4307(1994)) で置き換えるためのターゲッティングベクターを以下のように作製する。ECAT4のイントロン1を含有する4kbフラグメントを、マウスゲノムDNAを鋳型とし、プライマー (AGGGTCTGCTACTGAGATGCTCTG(配列番号:39)、AGGCAGGTCTTCAGAGGAAGGGCG(配列番号:40)) を用いてPCRで増幅することにより5'側アームを作製する。またエクソン3-イントロン3-エクソン4を含有する1.5kbフラグメントを、マウスゲノムDNAを鋳型とし、プライマー (CGGGCTGTAGACCTGTCTGCATTCTG(配列番号:41)、GGTCCTTCTGTCTCATCCTCGAGAGT(配列番号:42)) を用いてPCRで増幅することにより3'側アームを作製する。これら5'側アームと3'側アームをIRES- β geoカセットにライゲートし、ターゲッティングベクターを作製する。このターゲッティングベクターをSacII で切断し、エレクトロポレーションによりRF8 ES細胞に導入する (Meiner et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93: 14041-14046(1996)参照)。その後G418選択培地にて、相同組み換えが正しく起こったクローンを選択する。この β geoとの相同組み換えES細胞をマウスのブラストシストにインジェクションすることによりキメラマウスを経てヘテロ変異マウス (ECAT4 ^{β geo^{0/+}}マウス) を樹立する。

【0090】

次にこのECAT4 ^{β geo^{0/+}}マウスからリンパ球、皮膚細胞などの体細胞を単離する。この体細胞に対して被験物質を添加し、ES細胞の培養条件（例えばMeiner, V.L., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, 93(24): p14041-14046(1996)を参照）でフィーダー細胞上で細胞培養し、G418 (0.25mg/ml) で選択を行う。G418による選択で生存細胞が認められた場合、ここで用いた被験物質を、体細胞の核初期化物質の候補物質として選択する。

例えば被験物質としてES細胞由来のcDNAライブラリーを用いる場合は、前記体細胞対

してリポフェクション法等の公知の手法でcDNAライブラリー由来のcDNAプールをトランスフェクトし、前記手法にてG418で選択を行い、生存細胞の有無を確認する。生存細胞が確認された場合、そのcDNAプールをさらに幾つかのプールに分けて体細胞にトランスフェクトする。この実験を繰り返すことにより、最終的に、ES細胞由来の体細胞核初期化(候補)因子を選択することができる。

【0091】

例4: ECAT5遺伝子を利用したスクリーニング

ECAT5遺伝子を利用した本発明のスクリーニング方法の具体例として、以下(a)及び(b) :

- (a) ECAT5遺伝子に薬剤耐性遺伝子を含む遺伝子をノックインした遺伝子を含有する体細胞と、被験物質とを接触させる工程、
 - (b) 前記(a)の工程の後、選択培地中での生存細胞の有無を調べ、該生存細胞を生じさせた被験物質を体細胞の核初期化候補物質として選択する工程、
- を含むスクリーニング方法が例示される。

【0092】

後述の実施例に示したように、ECAT5遺伝子はES細胞の維持に必須の因子ではない。従って、ECAT5遺伝子にマーカー遺伝子をホモでノックインした体細胞を用いて本発明のスクリーニングを行うことが好ましい。

ECAT5遺伝子にマーカー遺伝子をホモでノックインしたノックインマウス (ECAT5 ^{β geo/ β geo}マウス) は、例えば後述の実施例2に記載の方法 (特開2003-265166号公報) で作製することができる。このECAT5 ^{β geo/ β geo}マウスからリンパ球、皮膚細胞などの体細胞を単離する。この体細胞に対して被験物質を添加し、ES細胞の培養条件 (例えばMeiner, V. L., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, 93(24): p14041-14046(1996)を参照) でフィーダー細胞上で細胞培養し、G418 (0.25mg/ml) で選択を行う。G418による選択で生存細胞が認められた場合、ここで用いた被験物質を、体細胞の核初期化物質の候補物質として選択する。

【0093】

例えば被験物質としてES細胞由来のcDNAライブラリーを用いる場合は、前記体細胞に対してリポフェクション法等の公知の手法でcDNAライブラリー由来のcDNAプールをトランスフェクトし、前記手法にてG418で選択を行い、生存細胞の有無を確認する。生存細胞が確認された場合、そのcDNAプールをさらに幾つかのプールに分けて体細胞にトランスフェクトする。この実験を繰り返すことにより、最終的に、ES細胞由来の体細胞核初期化(候補)因子を選択することができる。

【0094】

例5: 2つのECAT遺伝子を利用したスクリーニング

前述のように、2つの異なるECAT遺伝子にマーカー遺伝子をノックインしたホモ変異マウス同士を交配させることによりダブルノックインマウスを作製することができ、当該マウス由来の体細胞をスクリーニングに用いることができる。具体的には、ECAT2遺伝子とECAT3遺伝子の組み合わせに係るダブルノックインマウス由来の体細胞を用いたスクリーニング方法が例示される。すなわちECAT2遺伝子およびECAT3遺伝子を利用した本発明のスクリーニング方法の具体例として、以下(a)及び(b) :

- (a) ECAT2遺伝子およびECAT3遺伝子に、それぞれ薬剤耐性遺伝子を含む遺伝子をノックインした遺伝子を含有する体細胞と、被験物質とを接触させる工程、
 - (b) 前記(a)の工程の後、選択培地中での生存細胞の有無を調べ、該生存細胞を生じさせた被験物質を体細胞の核初期化候補物質として選択する工程、
- を含むスクリーニング方法が例示される。

【0095】

ここでノックインされる薬剤耐性遺伝子は、ECAT2遺伝子とECAT3遺伝子とで異なっていることが望ましい。この場合、2つの異なる薬剤耐性遺伝子 (例えばネオマイシン耐性遺伝子とハイグロマイシン耐性遺伝子) により二重に選択することが可能となるため、本発

明のスクリーニングにおいて擬陽性のES様細胞を選択する可能性が減少し、スクリーニングの成功確度が格段に向上される。

【0096】

ECAT2遺伝子およびECAT3遺伝子のダブルノックインマウス (ECAT2^{Hygro/Hygro} ECAT3 ^{β geo/ β geo}マウス) は、後述の実施例1および3 (ただし薬剤耐性遺伝子がハイグロマイシン耐性遺伝子) で作製したECAT2^{Hygro/Hygro}マウスとECAT3 ^{β geo/ β geo}マウスとを交配されることにより得ることができる。このECAT2^{Hygro/Hygro} ECAT3 ^{β geo/ β geo}マウスからリンパ球、皮膚細胞などの体細胞を単離する。この体細胞に対して被験物質を添加し、ES細胞の培養条件 (例えばMeiner, V.L., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, 93(24): p14041-14046(1996)を参照) でフィーダー細胞上で細胞培養し、G418(0.25mg/ml) およびハイグロマイシン (0.1mg/ml) で選択を行う。この選択で生存細胞が認められた場合、ここで用いた被験物質を、体細胞の核初期化物質の候補物質として選択する。

【0097】

例えば被験物質としてES細胞由来のcDNAライブラリーを用いる場合は、前記体細胞に対してリポフェクチン法等の公知の手法でcDNAライブラリー由来のcDNAプールをトランスフェクトし、前記手法にてG418およびハイグロマイシンで選択を行い、生存細胞の有無を確認する。生存細胞が確認された場合、そのcDNAプールをさらに幾つかのプールに分けて体細胞にトランスフェクトする。この実験を繰り返すことにより、最終的に、ES細胞由来の体細胞核初期化(候補)因子を選択することができる。

【0098】

本発明のスクリーニングで選択された体細胞核初期化(候補)物質が体細胞の核を初期化するか否かは、(1) 当該核初期化(候補)因子により体細胞から変換されたES様細胞がOct3/4やEcat4(Nanog)といったES細胞のマーカー遺伝子を発現しているか否か、(2) 前記ES細胞が *in vitro*においてレチノイン酸刺激等で分化するか否か、(3) 前記ES細胞をマウスプラストシストにインジェクションしてキメラマウスが誕生するか等を調べることにより、確認することができる。

【0099】

(2) 本発明の核初期化物質

本発明は、前記本発明のスクリーニング方法を用いて選択される体細胞核初期化物質を提供する。当該核初期化物質は、核酸、ペプチド、タンパク質、有機化合物、無機化合物のいずれかである。後述の実施例で用いたES細胞も体細胞核初期化物質の1つである。好ましくは、ES細胞由来の遺伝子またはタンパク質が例示される。本発明の核初期化物質は、幹細胞療法において有用である。すなわち、患者から体細胞(組織幹細胞、分化細胞)を採取し、これに本発明の核初期化物質を添加することにより、ES様細胞が出現する。このES様細胞をレチノイン酸、増殖因子(例えばEGF、FGF-2、BMP-2、LIF等)、またはグルココルチコイドなどにより、神経細胞、心筋細胞または血球細胞などに分化させ、これを患者に戻すことにより、幹細胞療法を達成することができる。

【0100】

(3) 本発明のノックインマウスの新規用途 (本発明スクリーニング用体細胞の供給源としての使用)

従来、ある遺伝子にマーカー遺伝子をノックインしたノックインマウスは、その遺伝子の機能解析のために利用されてきた。また場合によっては疾患モデル動物となり得るケースもあった。しかしながら本発明で開示された新たなスクリーニング方法で用いる体細胞の供給源としての利用はなされていない。

本発明は、ECAT遺伝子にマーカー遺伝子をノックインした遺伝子を含むノックインマウスの、本発明のスクリーニングにおいて用いる体細胞の供給源としての用途を提供するものである。

【0101】

当該ノックインマウスの作製法等については、前記(1)本発明のスクリーニング方法および後述の実施例において詳しく述べた通りである。当該ノックインマウスは、ECAT2遺

伝子、ECAT3遺伝子及び/又はECAT5遺伝子を用いる場合は、当該遺伝子にマーカー遺伝子をノックインした遺伝子を、ホモで含有することが好ましい。一方、ECAT4遺伝子にマーカー遺伝子をノックインした遺伝子を用いる場合はヘテロで含有することが好ましい。マーカー遺伝子としては、薬剤耐性遺伝子、蛍光タンパク質遺伝子、発光酵素遺伝子、発色酵素遺伝子またはこれらの組み合わせに係る遺伝子が挙げられる。中でも薬剤耐性遺伝子を含有する遺伝子が好ましい。

【0102】

(4) 本発明の体細胞

本発明は、ECAT遺伝子の発現調節領域により発現調節を受ける位置にマーカー遺伝子を存在させた遺伝子を含有する体細胞を提供する。

当該体細胞の作製法等については、前記(1)本発明の体細胞核初期化物質のスクリーニング方法および後述の実施例において詳しく述べた通りである。本発明の体細胞は、前記本発明のスクリーニング方法、または後述の本発明のES様細胞の選択方法において、有効に使用される。

【0103】

(5) 本発明のES様細胞の選択方法

本発明はまた、以下の(a)および(b)の工程：

(a) ECAT遺伝子の発現調節領域により発現調節を受ける位置にマーカー遺伝子を存在させた遺伝子を含有する体細胞と、体細胞の核初期化物質とを接触させる工程、

(b) 前記(a)の工程の後、マーカー遺伝子発現細胞をES様細胞として選択する工程、を含むES様細胞の選択方法を提供する。

【0104】

前記本発明のスクリーニング方法において述べたようなECAT遺伝子の発現調節領域により発現調節を受ける位置にマーカー遺伝子を存在させた体細胞は、ES様細胞の選択のためにも有効に用いられる。例えば幹細胞療法を念頭においた場合、ヒトの体細胞を核初期化物質で刺激することにより出現したES様細胞を、他の細胞（体細胞）から分離（純化）し、後の治療に用いることが望ましい。前述のように、本発明のシステムは、薬剤耐性遺伝子等のマーカー遺伝子の発現を指標として、ES様細胞を容易に選択できるシステムであるため、ES様細胞を選択・分離する際に有効に用いることができる。

本発明のES様細胞の選択方法は、前記ヒトの治療のみならず、イン・ビトロおよびイン・ビボでのES細胞関連の様々な研究において、ES細胞を選択（分離）する如何なる目的においても使用することができる。

【0105】

前記において、1) ECAT遺伝子の発現調節領域により発現調節を受ける位置にマーカー遺伝子を存在させた遺伝子を含有する体細胞の作製方法、2) 当該体細胞と体細胞核初期化物質との接触方法、および3) マーカー遺伝子発現細胞の選択方法については、全て「(1) 本発明の体細胞核初期化物質のスクリーニング方法」に記述したものと同様である。なお、マーカー遺伝子として薬剤耐性遺伝子を含む遺伝子を用いた場合は選択培地で培養することにより、マーカー遺伝子発現細胞を容易に選択（分離）することができる。またマーカー遺伝子として蛍光タンパク質遺伝子、発光酵素遺伝子、または発色酵素遺伝子を用いた場合は、セルソーター、限界希釈法または軟寒天コロニー法などを利用することにより、当該細胞を選択（分離）することができる。

前記で「核初期化物質」とは前記本発明のスクリーニングで得られるような、体細胞の核初期化に参与する物質を指す。なお、後述の実施例においては、体細胞の核初期化物質としてES細胞自身を用いることにより、マーカー遺伝子発現細胞をES様細胞として選択している。

【0106】

本発明のES様細胞選択方法においては、如何なるECAT遺伝子（ECAT1遺伝子、ECAT2遺伝子、ECAT3遺伝子、ECAT4遺伝子、ECAT5遺伝子、ECAT6遺伝子、ECAT7遺伝子、ECAT8遺伝子、ECAT9遺伝子およびOct3/4遺伝子）も使用することができる。具体例として、以下に示

した選択方法が例示される。

すなわちECAT2遺伝子を利用した選択方法として、以下の(a)および(b)：

(a)ECAT2遺伝子の発現調節領域により発現調節を受ける位置に薬剤耐性遺伝子を存在させた遺伝子を含有する体細胞と、体細胞の核初期化物質とを接触させる工程、

(b)前記(a)の工程の後、選択培地中での生存細胞をES様細胞として選択する工程、を含むES様細胞の選択方法が例示される。

【0107】

またECAT3遺伝子を利用した選択方法として、以下の(a)および(b)：

(a)ECAT3遺伝子の発現調節領域により発現調節を受ける位置に薬剤耐性遺伝子を存在させた遺伝子を含有する体細胞と、体細胞の核初期化物質とを接触させる工程、

(b)前記(a)の工程の後、選択培地中での生存細胞をES様細胞として選択する工程、を含むES様細胞の選択方法が例示される。

【0108】

またECAT5遺伝子を利用した選択方法として、以下の(a)および(b)：

(a)ECAT5遺伝子の発現調節領域により発現調節を受ける位置に薬剤耐性遺伝子を存在させた遺伝子を含有する体細胞と、体細胞の核初期化物質とを接触させる工程、

(b)前記(a)の工程の後、選択培地中での生存細胞をES様細胞として選択する工程、を含むES様細胞の選択方法が例示される。

【0109】

またECAT2遺伝子およびECAT3遺伝子を利用した選択方法として、以下の(a)および(b)：

(a)ECAT2遺伝子およびECAT3遺伝子の発現調節領域により発現調節を受ける位置に薬剤耐性遺伝子を存在させた遺伝子を含有する体細胞と、体細胞の核初期化物質とを接触させる工程、

(b)前記(a)の工程の後、選択培地中での生存細胞をES様細胞として選択する工程、を含むES様細胞の選択方法が例示される。

【0110】

またECAT4遺伝子を利用した選択方法として、以下の(a)および(b)：

(a)ECAT4遺伝子の発現調節領域により発現調節を受ける位置に薬剤耐性遺伝子を存在させた遺伝子を含有する体細胞と、体細胞の核初期化物質とを接触させる工程、

(b)前記(a)の工程の後、選択培地中での生存細胞をES様細胞として選択する工程、を含むES様細胞の選択方法が例示される。

【0111】

以上のようなES様細胞の選択方法において用いる体細胞は、ヒトの治療を念頭においた場合は、ECAT遺伝子発現調節領域により発現調節を受ける位置にマーカー遺伝子を挿入したベクターを含有するヒト体細胞であることが望ましい。具体的には以下のようにして作製された体細胞が用いられる。

【0112】

すなわちまず、患者の体細胞をヒトから単離することなどにより調製する。体細胞としては、疾患に関与する体細胞、疾患治療に関与する体細胞などが挙げられる。このヒト体細胞に対し、前記(1-2)の項に記載のいずれかのベクターを導入する。具体的にはBACベクター（ECAT遺伝子の発現調節領域の下流にマーカー遺伝子を存在させたBACベクター）またはPACベクターを導入することが望ましい。ここで導入するBACベクター（PACベクター）は1種類であっても、異なるECAT遺伝子を含有する2種類以上のBACベクターであっても良い。このBACベクター導入細胞に対して核初期化物質を添加することにより、ES様細胞を出現させる。このES様細胞を、用いたマーカー遺伝子の性質に応じて選択する。例えばマーカー遺伝子として薬剤耐性遺伝子を用いた場合は、核初期化物質添加後に選択培地で選択することにより、薬剤耐性を指標として、ES様細胞を容易に選択することができる。

【0113】

(6)本発明のES様細胞

本発明は、本発明の体細胞核初期化物質のスクリーニングにより出現したマーカー遺伝

子発現細胞（ES様細胞）、および本発明のES様細胞の選択方法により選択されたES様細胞を提供する。当該ES様細胞は、その後のインビトロおよびインビボでの評価において有効に用いることができる。すなわち当該ES様細胞の分化誘導能や、分化誘導した細胞の個体（マウス等）への移植定着などを調べることは、ヒトにおける幹細胞療法の予備検討やES細胞に関わる種々の研究において極めて重要である。本発明のES様細胞は、そのような研究や検討において有効に用いられる。

さらに本発明のES様細胞の選択法により出現したヒトのマーカー遺伝子発現細胞（ES様細胞）を、レチノイン酸、増殖因子（例えばEGF、FGF-2、BMP-2、LIF等）、またはグルココルチコイドなどにより、神経細胞、心筋細胞または血球細胞などに分化させ、これを患者に戻すことにより、幹細胞療法を達成することができる。

【0114】

(6) 本発明のES細胞未分化・多能性維持物質のスクリーニング方法

本発明は、以下の(a)および(b)の工程：

(a) ECAT遺伝子の発現調節領域により発現調節を受ける位置にマーカー遺伝子を存在させた遺伝子を含むES細胞を、ES細胞の未分化・多能性を維持できない培地中で被験物質と接触させる工程、

(b) 前記(a)の工程の後、マーカー遺伝子発現細胞の存在の有無を調べ、該細胞を存在させた被験物質をES細胞未分化・多能性維持の候補物質として選択する工程、を含むES細胞の未分化・多能性維持物質のスクリーニング方法を提供する。

【0115】

ECAT遺伝子の発現調節領域により発現調節を受ける位置にマーカー遺伝子を存在させたES細胞を、ES細胞としての状態（未分化・多能性）を維持できない培地中で培養した場合、マーカー遺伝子の発現は消失する。一方、前記培地中にES細胞の未分化・多能性維持物質が存在していれば、マーカー遺伝子の発現は存続する。この性質を利用することにより、ES細胞の未分化・多能性維持（候補）物質を容易にスクリーニングすることができる。

【0116】

前記スクリーニング工程(a)において用いられるES細胞としては、ECAT遺伝子の発現調節領域により発現調節を受ける位置にマーカー遺伝子を存在させた遺伝子を含むES細胞であればどのようなものであっても良い。具体的には、例えば、前記(1-1-a)に記載されたノックインマウス由来のES細胞、前記(1-1-b)に記載されたトランスジェニックマウス由来のES細胞、前記(1-2-a)に記載されたBACベクター若しくはPACベクターを含むES細胞、前記(1-2-b)に記載されたプラスミドベクターを含むES細胞、若しくは前記(1-2-c)に記載されたターゲッティングベクターを含むES細胞を挙げることができる。

【0117】

前記スクリーニング工程(a)において用いられる「ES細胞の未分化・多能性を維持できない培地」とは、ES細胞としての状態を維持できない培地、未分化状態を維持できない培地であれば、どのような培地であっても良い。例えばマウスES細胞は、低密度では、その維持（未分化・多能性維持）に血清またはフィーダー細胞が必須であることが知られているため、当該ES細胞の培養条件から血清、フィーダー細胞又はその両者を除去した条件が挙げられる。またヒトES細胞の維持（未分化・多能性維持）にはフィーダー細胞が必須であるため、ヒトES細胞の培養条件からフィーダー細胞を除去した条件が挙げられる。さらにヒトES細胞の場合はフィーダー細胞存在下でも分化する細胞が出現するため、フィーダー細胞存在下の培養条件でも良い。

具体的には、文献（Meiner, V.L., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, 93(24): p 14041-14046(1996)）に記載のES細胞の培養条件から血清、フィーダー細胞又はその両者を除去した条件などが例示される。

【0118】

前記工程(a)は、前記ES細胞を、ES細胞の未分化・多能性を維持できない培地中で被験物質と接触させることにより行われる。被験物質は、ES細胞を未分化・多能性非維持培地に移す前に、また移す際に、若しくは移した後に、当該ES細胞と接触させる。

本スクリーニングで用いられる被験物質は、制限されないが、核酸、ペプチド、タンパク質、有機化合物、無機化合物などであり、本発明のスクリーニングは、具体的にはこれらの被験物質またはこれらを含む試料（被験試料）を前記ES細胞と接触させることにより行われる。かかる被験試料としては、細胞分泌産物、血清、細胞抽出液、遺伝子（ゲノム、cDNA）ライブラリー、RNAiライブラリー、アンチセンス核酸、合成低分子化合物、合成ペプチド、天然化合物などが挙げられる。具体的には、動物血清またはその画分、フィーダー細胞の分泌産物またはその画分などが挙げられる。

これら被験試料は、体細胞への取り込み可能な形態で体細胞と接触させる。例えば被験試料が核酸（cDNAライブラリー等）の場合は、リン酸カルシウム、DEAE-デキストランや遺伝子導入用リピッドを用いて体細胞に導入する。

【0119】

マーカー遺伝子として薬剤耐性遺伝子を含む遺伝子を用いた場合は、対応する薬剤を含む培地（選択培地）で選択を行う。当該薬剤は、ES細胞と被験物質との接触の際に培地に含まれていても良く、また接触後に含ませても良い。さらに被験物質存在下、ES細胞の未分化・多能性非維持培地中で培養した後に前記薬剤を培地に含ませても良い。

【0120】

前記工程(a)の後、マーカー遺伝子発現細胞の存在の有無を調べ、該細胞を存在させた被験物質をES細胞の未分化・多能性維持の候補物質として選択する（工程(b)）。当該工程(b)については、前記「(1)本発明の体細胞核初期化物質のスクリーニング方法」に記載した通りである。マーカー遺伝子発現細胞が認められた場合、ここで用いた被験試料（被験物質）を、ES細胞の未分化・多能性維持の候補物質として選択する。

前記スクリーニングは、必要に応じて何度でも繰り返し行うことができる。例えば1回目のスクリーニングでフィーダー細胞分泌産物や血清といった混合物を用いた場合、2回目以降は、さらに当該混合物を細分化（分画）して同様のスクリーニングを繰り返し行うことにより、最終的に、ES細胞の未分化・多能性維持の候補物質を選択することができる。

。なお、前記のように被験試料として混合物を用いてスクリーニングを行った場合、ES細胞の未分化・多能性維持物質と共にES細胞の増殖促進物質も選択される可能性がある。すなわち、ある混合物（画分A）を前記本発明のスクリーニング方法に供し、生存細胞が確認され且つ当該生存細胞の細胞数が増加した場合には、当該画分中には、ES細胞の未分化・多能性維持物質と共に、ES細胞の増殖促進物質も含まれていると考えられる（もちろん1つの物質が両方の性質を兼ね備えている場合もある）。その場合、当該画分Aをさらに分画し、片方の画分（画分B）を本発明のスクリーニングに供した場合には生存細胞が確認されるが細胞数の増加は認めらず、もう片方の画分（画分C）を本発明のスクリーニングに供した場合は生存細胞が認められなかった場合、画分BにはES細胞の未分化・多能性維持物質が含まれ、画分CにはES細胞の増殖促進物質が含まれることが考えられる。本発明のスクリーニングは、そのようなES細胞の増殖促進（候補）物質の選択にも有用である。

【0121】

以下、前記スクリーニング方法の具体例として、ECAT2遺伝子、ECAT3遺伝子、ECAT4遺伝子およびECAT5遺伝子を利用したスクリーニング方法につき例示するが、他のECAT遺伝子についても以下を参考にして同様に実施することができる。

【0122】

例1：ECAT2遺伝子を利用したスクリーニング

ECAT2遺伝子を利用したES細胞未分化・多能性維持物質のスクリーニング方法の具体例として、以下(a)および(b)：

- (a) ECAT2遺伝子に薬剤耐性遺伝子を含む遺伝子をノックインした遺伝子を含むES細胞を、ES細胞の未分化・多能性を維持できない培地中で被験物質と接触させる工程、
- (b) 前記(a)の工程の後、選択培地中での生存細胞の有無を調べ、該生存細胞を存在させた被験物質をES細胞未分化・多能性維持の候補物質として選択する工程、

を含むスクリーニング方法が例示される。

【0123】

後述の実施例に示したように、ECAT2遺伝子はES細胞の維持・増殖に必須の因子ではない。従って、ECAT2遺伝子にマーカー遺伝子をホモでノックインしたES細胞を用いて本発明のスクリーニングを行うことが好ましい。当該ES細胞は、例えば実施例3に記載の方法で作製することができる（ECAT2遺伝子ホモ変異RF8 ES細胞）。このES細胞を、被験物質存在下、文献（Meiner, V.L., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, 93(24): p14041-14046(1996)）に記載のES細胞の培養条件から血清、フィーダー細胞又はその両者を除去した条件で培養する。その後G418 (0.25mg/ml) およびハイグロマイシン (0.1mg/ml) で選択を行う。2つの薬剤による選択で生存細胞が認められた場合、ここで用いた被験物質を、ES細胞未分化・多能性維持の候補物質として選択する。

【0124】

例えば被験物質としてフィーダー細胞分泌産物を用いる場合は、前記ES細胞に対してフィーダー細胞分泌産物を添加し、前記手法にてG418およびハイグロマイシンで選択を行い、生存細胞の有無を確認する。生存細胞が確認された場合、その分泌産物をさらに幾つかの画分に分けてES細胞に添加する。この実験を繰り返すことにより、最終的に、ES細胞の未分化・多能性維持(候補)因子を選択することができる。また併せて生細胞数の増加を指標としてES細胞の増殖促進(候補)物質を選択することもできる。

【0125】

例2: ECAT3遺伝子を利用したスクリーニング

ECAT3遺伝子を利用したES細胞未分化・多能性維持物質のスクリーニング方法の具体例として、以下(a)および(b)：

- (a) ECAT3遺伝子に薬剤耐性遺伝子を含む遺伝子をノックインした遺伝子を含むES細胞を、ES細胞の未分化・多能性を維持できない培地中で被験物質と接触させる工程、
 - (b) 前記(a)の工程の後、選択培地中での生存細胞の有無を調べ、該生存細胞を存在させた被験物質をES細胞未分化・多能性維持の候補物質として選択する工程、
- を含むスクリーニング方法が例示される。

【0126】

後述の実施例に示したように、ECAT3遺伝子はES細胞の維持・増殖に必須の因子ではない。従って、ECAT3遺伝子にマーカー遺伝子をホモでノックインしたES細胞を用いて本発明のスクリーニングを行うことが好ましい。当該ES細胞は、例えば、実施例1で作製した β geoベクターとの相同組み換えES細胞に対して、さらにHygroベクター（ECAT3遺伝子をHygro遺伝子で置き換えるためのターゲティングベクター）を導入することにより、ECAT3遺伝子がホモ変異となったRF8 ES細胞を作製することができる。この細胞を、被験物質存在下、文献（Meiner, V.L., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, 93(24): p14041-14046(1996)）に記載のES細胞の培養条件から血清、フィーダー細胞又はその両者を除去した条件で培養する。その後G418 (0.25mg/ml) およびハイグロマイシン (0.1mg/ml) で選択を行う。2つの薬剤による選択で生存細胞が認められた場合、ここで用いた被験物質を、ES細胞未分化・多能性維持の候補物質として選択する。

【0127】

例えば被験物質としてフィーダー細胞分泌産物を用いる場合は、前記ES細胞に対してフィーダー細胞分泌産物を添加し、前記手法にてG418およびハイグロマイシンで選択を行い、生存細胞の有無を確認する。生存細胞が確認された場合、その分泌産物をさらに幾つかの画分に分けてES細胞に添加する。この実験を繰り返すことにより、最終的に、ES細胞の未分化・多能性維持(候補)因子を選択することができる。また併せて生細胞数の増加を指標としてES細胞の増殖促進(候補)物質を選択することもできる。

【0128】

例3: ECAT4遺伝子を利用したスクリーニング

ECAT4遺伝子を利用したES細胞未分化・多能性維持物質のスクリーニング方法の具体例として、以下(a)および(b)：

(a) ECAT4遺伝子に薬剤耐性遺伝子を含む遺伝子をノックインした遺伝子を含有するES細胞を、ES細胞の未分化・多能性を維持できない培地中で被験物質と接触させる工程、
(b) 前記(a)の工程の後、選択培地中での生存細胞の有無を調べ、該生存細胞を存在させた被験物質をES細胞未分化・多能性維持の候補物質として選択する工程、
を含むスクリーニング方法が例示される。

【0129】

ECAT遺伝子はES細胞の維持・増殖に必須の因子である。従って、ECAT4遺伝子にマーカー遺伝子をヘテロでノックインしたES細胞を用いて本発明のスクリーニングを行う。

ECAT4遺伝子にマーカー遺伝子をヘテロでノックインしたES細胞は、前記ECAT2やECAT3と同様にターゲティングベクター（例えばECAT4遺伝子を β geo遺伝子で置き換えるためのターゲティングベクター）をES細胞に導入・相同組み換えを起こすことにより作製することができる。この細胞を、被験物質存在下、文献（Meiner, V.L., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, 93(24): p14041-14046(1996)）に記載のES細胞の培養条件から血清、フィーダー細胞又はその両者を除去した条件で培養する。その後G418 (0.25mg/ml) で選択を行う。G418による選択で生存細胞が認められた場合、ここで用いた被験物質を、ES細胞未分化・多能性維持の候補物質として選択する。

【0130】

例えば被験物質としてフィーダー細胞分泌産物を用いる場合は、前記ES細胞に対してフィーダー細胞分泌産物を添加し、前記手法にてG418で選択を行い、生存細胞の有無を確認する。生存細胞が確認された場合、その分泌産物をさらに幾つかの画分に分けてES細胞に添加する。この実験を繰り返すことにより、最終的に、ES細胞の未分化・多能性維持(候補)因子を選択することができる。また併せて生細胞数の増加を指標としてES細胞の増殖促進(候補)物質を選択することもできる。

【0131】

例4: ECAT5遺伝子を利用したスクリーニング

ECAT5遺伝子を利用したES細胞未分化・多能性維持物質のスクリーニング方法の具体例として、以下(a)および(b)：

(a) ECAT5遺伝子に薬剤耐性遺伝子を含む遺伝子をノックインした遺伝子を含有するES細胞を、ES細胞の未分化・多能性を維持できない培地中で被験物質と接触させる工程、
(b) 前記(a)の工程の後、選択培地中での生存細胞の有無を調べ、該生存細胞を存在させた被験物質をES細胞未分化・多能性維持の候補物質として選択する工程、
を含むスクリーニング方法が例示される。

【0132】

後述の実施例に示したように、ECAT5遺伝子はES細胞の維持に必須の因子ではない。従って、ECAT5遺伝子にマーカー遺伝子をホモでノックインしたES細胞を用いて本発明のスクリーニングを行うことが好ましい。当該ES細胞の作製法およびそれを用いたスクリーニング法は、前記ECAT2やECAT3の場合と同様である。

【0133】

前記本発明のスクリーニングにより選択されたES細胞の未分化・多能性維持(候補)物質がES細胞の未分化・多能性を維持するか否かは、ES細胞の未分化・多能性を維持できない培地中に当該候補物質を添加した培養条件下でES細胞を培養し、ES細胞としての種々の能力を調べることにより、確認することができる。具体的には、例えば前記培養条件下で培養したES細胞が、(1) Oct3/4やEcat4(Nanog)といったES細胞のマーカー遺伝子を発現しているか否か、(2) 前記ES細胞が *in vitro*においてレチノイン酸刺激等で分化するか否か、(3) 前記ES細胞をマウスプラストシストにインジェクションしてキメラマウスが誕生するか等を調べることにより、確認することができる。

【0134】

(7) 本発明のES細胞未分化・多能性維持物質

本発明は前記スクリーニング方法を用いて選択されるES細胞未分化・多能性維持物質を提供する。当該ES細胞の未分化・多能性維持物質は、核酸、ペプチド、タンパク質、有機

化合物、無機化合物のいずれかであり、好ましくは、フィーダー細胞分泌産物または血清由来成分が例示される。本発明のES細胞未分化・多能性維持物質は、ES細胞の臨床応用において有用である。すなわち臨床応用においては、ヒトES細胞またはそれから分化させた分化細胞を無血清下、フィーダー細胞非存在下で培養することが必須となるため、本発明のES細胞未分化・多能性維持物質の無血清培地への添加により、前記ES細胞の臨床応用が可能となる。

【0135】

(8) 本発明のノックインマウスの新規用途（本発明スクリーニング用ES細胞の供給源としての使用）

本発明は、本発明のノックインマウスの、ES細胞未分化・多能性維持物質スクリーニング用のES細胞の供給源としての用途を提供する。本発明のノックインマウスについては前記(3)に記載した通りである。ノックインマウスからのES細胞の単離は、当業者に周知の手法により行うことができる。

【0136】

(9) 本発明のES細胞

本発明は、ECAAT遺伝子の発現調節領域により発現調節を受ける位置にマーカー遺伝子を存在させた遺伝子を含有するES細胞を提供する。当該ES細胞の作製法等については、前記(1)および(6)において詳しく述べたとおりである。本発明のES細胞は、ES細胞の未分化・多能性維持物質のスクリーニング方法において有効に使用される。

【0137】

以下、実施例により本発明を具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例によりなんら限定されるものではない。

【実施例1】

【0138】

ECAT3遺伝子を利用したES類似細胞の選択システム

ECAT3遺伝子のコーディング領域を β ガラクトシダーゼとネオマイシン耐性遺伝子の融合遺伝子（ β geo）に置き換え、ECAT3遺伝子をノックアウトするとともに、ECAT3遺伝子の発現をX-Gal染色や薬剤耐性でモニターできるようにしたホモ変異ノックインマウス（以下、ECAT3 β geo/ β geoマウス）を作製した。このECAT3 β geo/ β geoマウスの作製は文献（Tokuzawa, Y., et al., Molecular and Cellular Biology, 23(8): 2699-2708(2003)）の記載に基づき行った。簡単に述べると以下ようになる。

【0139】

まず、マウスECAT3遺伝子を含有するBACクローンを、ECAT3 cDNAの一部をプライマーに用いたPCRスクリーニングにより、BACライブラリー（Research Genetics）のDNAプールから同定し、塩基配列を決定した。

マウスECAT3遺伝子のエクソン3～エクソン7を、IRES- β geoカセット（Mountford et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91:4303-4307(1994)）で置き換えるためのターゲッティングベクターを以下のように作製した。ECAT3のイントロン1～エクソン3を含有する1.4kbフラグメントを、前記マウスBAC DNAを鋳型とし、プライマー（ACCAAGGTCACCGCATCCAA（配列番号：43）、CTTCACCAAGATTTCCGATG（配列番号：44））を用いてPCRにより増幅することにより5'側アームを作製した。またエクソン7～エクソン8を含有する3.5kbフラグメントを、マウスBAC DNAを鋳型とし、プライマー（GAATGGTGGACTAGCTTTTG（配列番号：45）、TGCCATGAA TGTCGATATGCAG（配列番号：46））を用いてPCRにより増幅することにより3'側アームを作製した。これら5'側アームと3'側アームを β geoカセットにライゲートし、ターゲッティングベクターを作製した。このターゲッティングベクターをNotIで切断し、エレクトロポレーションによりRF8 ES細胞（Meiner et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93: 14041-14046 (1996)）に導入した。G418選択培地にて、相同組み換えが正しく起こったクローンを選択した。この β geoとの相同組み換えES細胞をマウス（C57BL/6）のプラストシストにインジェクションすることによりキメラマウスを経てヘテロ変異マウス（ECAT3 β geo/+マウス）を樹立し、さらにヘテロ変異マウス同士の交配から、ホモ変異マウス（ECAT3 β geo/ β geoマウス）を作製した。

ス)がメンデルの法則に従って誕生した。

【0140】

次に、ECAT3 ^{β geo/ β geo}マウスの胸腺から常法によりリンパ球を採取した。この細胞を文献 (Meiner, V.L., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, 93(24): p14041-14046(1996)) に記載のES細胞の培養条件で2日間培養し、G418 (0.25mg/ml) で選択した。その結果、これらリンパ球はすべて死滅し、薬剤耐性コロニーは一つも得られなかった。またこのG418濃度では正常ES細胞はすべて死滅することも確認された。

【0141】

次に、ECAT3 ^{β geo/ β geo}マウス由来のリンパ球とRF8細胞とを、多田らの方法 (Tada, M., et al., Curr. Biol., 11(19): p1553-1558(2001)) に従って電氣的に融合し、前記ES細胞の培養条件でフィーダー細胞 (STO細胞) 上で2日間培養し、G418 (0.25mg/ml) で選択したところ、多数のES細胞様コロニーが得られた。これらのコロニーを単離、培養し、RNAを回収した。ノザンプロットによりこれらの細胞は全クローンにおいてOct3/4やECAT4 (Nanog) を発現しており、またこのクローンをマウスブラストシストに移植したところキメラマウスが形成されたことから、G418で選択された細胞は確かにES細胞としての性質を有するES様細胞であることが明らかとなった (図1)。これらの細胞をフローサイトメトリー (FACS) で解析したところ、大きさ (Forward scatter) は約2倍となり、DNA量も4倍体となっていた (図2)。以上のことから、これらのコロニーはECAT3 ^{β geo/ β geo}マウス由来のリンパ球と正常ES細胞との融合により、リンパ球核の初期化 (ES細胞化) が起こったためにG418耐性になったことが分かった。このようにECAT3 ^{β geo/ β geo}マウス由来の体細胞は、ES様細胞に変換された時のみ薬剤耐性となる。従ってこの性質を利用すれば、ES様細胞の選択や、ES様細胞への変換を誘導する核初期化因子を容易にスクリーニングできることが明らかとなった。

【実施例2】

【0142】

ECAT5遺伝子を利用したES類似細胞の選択システム

ECAT5遺伝子のコーディング領域を β geoに置き換えたホモ変異ノックインマウス (ECAT5 ^{β geo/ β geo}マウス) を文献 (Takahashi, K., K. Mitsui, and S. Yamanaka, Nature, 423(6939): p541-545(2003)、特開2003-265166号公報) 記載の方法に基づき作製した。このECAT5 ^{β geo/ β geo}マウス由来のリンパ球を用いて、上記と同様のプロトコールで実験を行った。ECAT5 ^{β geo/ β geo}マウス 2×10^6 個のリンパ球を 4×10^5 個のES細胞と融合し、G418で選択培養したところ、実施例1で行ったECAT3の場合よりは数が少ないものの、同様のES細胞様コロニーが得られた。よってECAT5も同様にES様細胞の選択システムに利用できることが分かった。

【0143】

なおECAT3の場合よりもコロニー数が少なかった理由としては、ES細胞に極めて特異的に発現するという観点からは両者は同じであるものの、ECAT3はES細胞の維持や増殖にとっては必須ではないのに対し、ECAT5はES細胞の増殖を促進する因子であるため、その遺伝子量の減少 (ノックアウト) はES細胞化にとって不利になっていることが考えられた。

【実施例3】

【0144】

ECAT2遺伝子を利用したES類似細胞の選択システム

ECAT2遺伝子がES細胞で特異的に発現することは、既にノザンプロット解析により明らかになっている (WO 02/097090 号公報参照)。さらに詳細な発現解析をRT-PCRにより行ったところ、未分化ES細胞での特異的な発現が確認された (図3)。またサイクル数を増やすことにより精巣、および卵巣でも発現するが体組織では全く発現が認められなかった (図3)。

【0145】

マウスECAT2ゲノム配列を、公的データベースであるMouse Genome Resources (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/guide/mouse/>) により同定した。このECAT2ゲノムを含有す

るBACクローンをPCRとサザンハイブリダイゼーションによりクローニングした。

ECAT2遺伝子をノックアウトするためにエクソン1~3を β geo (β ガラクトシダーゼとネオマイシン耐性遺伝子の融合遺伝子) またはHygro (ハイグロマイシン耐性遺伝子) と置換するためのターゲッティングベクターを作製した。すなわち、マウスECAT2遺伝子のエクソン1~3をIRES (internal ribosome entry site)- β geoカセット若しくはIRES-Hygroカセットで置換するようにデザインしたターゲッティングベクターを作製した。

【0146】

具体的にはまず、マウスECAT2ゲノムの5' flanking領域~エクソン1の領域を含有するフラグメントと、エクソン3~3' flanking領域を含有するフラグメントを、それぞれ前記BACクローンを鋳型としたPCRにより増幅し、これらをそれぞれターゲッティングベクターの5'-アームおよび3'-アームとした。5'-アームはプライマー (CCGCGGAAAGTCAAGAGATTGGGTGG (配列番号: 47)、GCGGCCCGCCTTTACGGGTCACGAGGGTCAC (配列番号: 48)) により増幅し、3'-アームはプライマー (TGTGGCCAGTGTGTTGTTCTGGCGGG (配列番号: 49)、CTCGAGGACTCGCATTCTAGCCAAG (配列番号: 50)) により増幅した。得られた2つの増幅断片をpBSSK(-)-IRES- β geoまたはpBSSK(-)-IRES-Hygroの IRES- β geoカセット若しくはIRES-Hygroカセットにライゲーションすることによりターゲッティングベクターを完成し、これをSacIIで切断して直鎖化した。

前記ターゲッティングベクターによるECAT2遺伝子破壊の概略を図4に示す。

【0147】

直鎖化したターゲッティングベクターをエレクトロポレーションによりRF8ES細胞 (Meiner, V. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93: 14041-14046(1996)) に導入し、各薬剤 (β geoの場合はネオマイシン (G418)、Hygroの場合はハイグロマイシン) により選択した。相同組み換えが正しく起こっていることの確認はサザンブロットにて行った。すなわち、前記ES細胞から抽出したゲノムDNAをPstIで切断後、電気泳動し、ナイロンメンブランへ転写した。これをECAT2遺伝子の3'領域のプロンプとハイブリダイゼーションさせた。正常ゲノムからは18kbpのバンド、 β geoベクターとの相同組み換えでは13kbpのバンド、そしてHygroベクターとの相同組み換えでは9kbpのバンドが検出される。結果を図5に示す。各薬剤耐性ES細胞において相同組換えが正しく起こっていることが確認された。

さらにHygroベクターとの相同組み換えES細胞に β geoベクターを導入し、ネオマイシンで選択したところ、両方で相同組み換えが起こった、すなわちECAT2遺伝子がホモ変異となったES細胞を3クローン得ることが出来た。 β geoベクターとHygroベクターの両方で正しく相同組換えが起こっていることは前記と同様のサザンブロットにより確認した (図5)。またノザンブロットにより、これらのクローンはECAT2の発現が消失していることが確認できた (図6)。

【0148】

このホモ変異ES細胞がES細胞としての機能を保持しているかどうかを調べたところ、形態、増殖、分化能すべてが正常であった。以上の結果から、ECAT2はES細胞、精巣、卵巣に特異的に発現するが、ESの維持や初期発生には必須でない因子であることが分かった。従って、ECAT3遺伝子と同様にES細胞の選択に極めて有効に利用できることが明らかとなった。

次に、 β geoとの相同組み換えES細胞をマウス (C57BL/6) のブラストシストにインジェクションすることによりキメラマウスを経てヘテロ変異マウスを樹立した。さらにヘテロ変異マウス同士の交配から、ホモ変異マウスがメンデルの法則に従って誕生した。このホモ変異マウス由来の体細胞を用いて、実施例1と同様のプロトコールで実験を行うことにより、実施例1と同様にES細胞様コロニーを得ることができる。

すなわち、ECAT2 β geo/ β geoマウスの胸腺から常法によりリンパ球を採取し、実施例1と同様のプロトコールでこのリンパ球とES細胞 (RF8細胞) とを融合し、G418で選択培養したところ、実施例1と同様に多数のES細胞様コロニーが得られた。従ってECAT2もECAT3と同様に核初期化因子のスクリーニング等に利用できることが分かった。

【実施例4】

【0149】

ECAT3 ^{β geo/ β geo}マウス由来の体細胞を用いた体細胞核初期化物質のスクリーニング

ECAT3 ^{β geo/ β geo}マウスからリンパ球、皮膚細胞などの体細胞を単離する。この体細胞に対して被験物質を添加し、文献 (Meiner, V.L., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, 93(24): p14041-14046(1996)) に記載のES細胞の培養条件でフィーダー細胞上で細胞培養し、G418 (0.25mg/ml) で選択を行う。G418による選択で生存細胞が認められた場合、ここで用いた被験物質を、体細胞の核初期化物質の候補物質として選択する。

例えば被験物質としてES細胞由来のcDNAライブラリーを用いる場合は、前記体細胞に対してリポフェクチン法等の公知の手法でcDNAライブラリー由来のcDNAプールをトランスフェクトし、前記手法にてG418で選択を行い、生存細胞の有無を確認する。生存細胞が確認された場合、そのcDNAプールをさらに幾つかのプールに分けて体細胞にトランスフェクトする。この実験を繰り返すことにより、最終的に、ES細胞由来の体細胞核初期化 (候補) 因子を選択することができる。

【実施例 5】

【0150】

ECAT2 ^{β geo/ β geo}マウス由来の体細胞を用いた体細胞核初期化物質のスクリーニング

ECAT2 ^{β geo/ β geo}マウスからリンパ球、皮膚細胞などの体細胞を単離する。この体細胞に対して被験物質を添加し、文献 (Meiner, V.L., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, 93(24): p14041-14046(1996)) に記載のES細胞の培養条件でフィーダー細胞上で細胞培養し、G418 (0.25mg/ml) で選択を行う。G418による選択で生存細胞が認められた場合、ここで用いた被験物質を、体細胞の核初期化物質の候補物質として選択する。

例えば被験物質としてES細胞由来のcDNAライブラリーを用いる場合は、前記体細胞に対してリポフェクチン法等の公知の手法でcDNAライブラリー由来のcDNAプールをトランスフェクトし、前記手法にてG418で選択を行い、生存細胞の有無を確認する。生存細胞が確認された場合、そのcDNAプールをさらに幾つかのプールに分けて体細胞にトランスフェクトする。この実験を繰り返すことにより、最終的に、ES細胞由来の体細胞核初期化 (候補) 因子を選択することができる。

【実施例 6】

【0151】

ECAT2^{Hygro/Hygro}・ECAT3 ^{β geo/ β geo}ダブルノックインマウス由来の体細胞を用いた体細胞核初期化物質のスクリーニング

ECAT2^{Hygro/Hygro}・ECAT3 ^{β geo/ β geo}ダブルノックインマウスはECAT2^{Hygro/Hygro}マウスとECAT3 ^{β geo/ β geo}マウスを交配させることにより得ることができる。このダブルノックインマウスからリンパ球、皮膚細胞などの体細胞を単離する。この体細胞に対して被験物質を添加し、文献 (Meiner, V.L., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, 93(24): p14041-14046(1996)) に記載のES細胞の培養条件でフィーダー細胞 (細胞名) 上で細胞培養し、G418 (0.25mg/ml) およびハイグロマイシン (0.1mg/ml) で選択を行う。2つの薬剤による選択で生存細胞が認められた場合、ここで用いた被験物質を、体細胞の核初期化物質の候補物質として選択する。

例えば被験物質としてES細胞由来のcDNAライブラリーを用いる場合は、前記体細胞に対してリポフェクチン法等の公知の手法でcDNAライブラリー由来のcDNAプールをトランスフェクトし、前記手法にて薬剤選択を行い、生存細胞の有無を確認する。生存細胞が確認された場合、そのcDNAプールをさらに幾つかのプールに分けて体細胞にトランスフェクトする。この実験を繰り返すことにより、最終的に、ES細胞由来の体細胞核初期化 (候補) 因子を選択することができる。

【実施例 7】

【0152】

ECAT2遺伝子ホモ変異ES細胞を用いたES細胞未分化・多能性維持物質のスクリーニング

実施例3で作製したECAT2遺伝子がホモ変異となったRF8 ES細胞を、被験物質存在下、文献 (Meiner, V.L., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, 93(24): p14041-14046(1996))

)) に記載のES細胞の培養条件から血清、フィーダー細胞又はその両者を除去した条件で培養する。その後G418 (0.25mg/ml) およびハイグロマイシン (0.1mg/ml) で選択を行う。2つの薬剤による選択で生存細胞が認められた場合、ここで用いた被験物質を、ES細胞未分化・多能性維持の候補物質として選択する。

例えば被験物質としてフィーダー細胞分泌産物を用いる場合は、前記ES細胞に対してフィーダー細胞分泌産物を添加し、前記手法にてG418およびハイグロマイシンで選択を行い、生存細胞の有無を確認する。生存細胞が確認された場合、その分泌産物をさらに幾つかの画分に分けてES細胞に添加する。この実験を繰り返すことにより、最終的に、ES細胞の未分化・多能性維持(候補)因子を選択することができる。

【実施例 8】

【0153】

ECAT3遺伝子ホモ変異ES細胞を用いたES細胞未分化・多能性維持物質のスクリーニング

実施例1で作製した β geoベクターとの相同組み換えES細胞に対して、さらにHygroベクター (ECAT3遺伝子をHygro遺伝子で置き換えるためのターゲッティングベクター) を導入し、ECAT3遺伝子がホモ変異となったRF8 ES細胞を作製する。この細胞を、被験物質存在下、文献 (Meiner, V.L., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, 93(24): p14041-14046(1996)) に記載のES細胞の培養条件から血清、フィーダー細胞又はその両者を除去した条件で培養する。その後G418 (0.25mg/ml) およびハイグロマイシン (0.1mg/ml) で選択を行う。2つの薬剤による選択で生存細胞が認められた場合、ここで用いた被験物質を、ES細胞未分化・多能性維持の候補物質として選択する。

例えば被験物質としてフィーダー細胞分泌産物を用いる場合は、前記ES細胞に対してフィーダー細胞分泌産物を添加し、前記手法にてG418およびハイグロマイシンで選択を行い、生存細胞の有無を確認する。生存細胞が確認された場合、その分泌産物をさらに幾つかの画分に分けてES細胞に添加する。この実験を繰り返すことにより、最終的に、ES細胞の未分化・多能性維持(候補)因子を選択することができる。

【産業上の利用可能性】

【0154】

本発明により、体細胞核初期化物質の効率的なスクリーニング方法が提供される。核初期化物質は、幹細胞療法を現実化するために極めて重要な物質であり、本発明のスクリーニング方法により、そのような核初期化物質の早期発見が可能となる。さらに本発明により、ES細胞未分化・多能性維持物質の効率的なスクリーニング方法が提供される。ES細胞未分化・多能性維持物質はES細胞の臨床応用において極めて重要な物質であり、本発明のスクリーニング方法により、そのようなES細胞未分化・多能性維持物質の早期発見が可能となる。

【図面の簡単な説明】

【0155】

【図1】 実施例1の概要を示した図である。ECAT3 β geo/ β geoマウスより単離したリンパ球と正常ES細胞とを融合し、G418で選択した結果、Oct3/4およびNanog(ECAT4)陽性のES様細胞が出現したことを示している。

【図2】 ECAT3 β geo/ β geoマウスより単離したリンパ球と正常ES細胞とを融合し、G418で選択した細胞をフローサイトメトリー (FACS) で解析した結果を示す図である。融合前 (図中WT) と比べ、融合細胞 (図中Fusion) では、大きさ (FSC) は約2倍となり、DNA量 (PI) も4倍体となったことを示している。

【図3】 ECAT2遺伝子の各種細胞・組織における発現をRT-PCRで解析した結果を示す図である。(A) はRT-PCRによる増幅サイクルを25回繰り返し結果を示し、また (B) は30回繰り返し結果を示す。ESG1はECAT2の結果を、NAT1はポジティブコントロールであるNAT1の結果を指す。各レーンは以下の細胞・組織におけるECAT2またはNAT1の発現を示す: レーン1: 未分化MG1.19細胞、レーン2: 分化MG1.19細胞、レーン3: RT-MG1.19細胞、レーン4: 未分化RF-8細胞、レーン5: 分化RF-8細胞、レーン6: RT-RF-8細胞、レーン7: 脳、レーン8: 心臓、レーン9: 腎臓、レーン10: 精

巢、レーン11：脾臓、レーン12：筋肉、レーン13：肺、レーン14：胃、レーン15：卵巣、レーン16：胸腺、レーン17：肝臓、レーン18：皮膚、レーン19：小腸。

【図4】ECAT2遺伝子を β geo (β ガラクトシダーゼとネオマイシン耐性遺伝子の融合遺伝子) またはHygro (ハイグロマイシン耐性遺伝子) でノックインするためのターゲティングベクターと、それを用いたECAT2遺伝子破壊の概念を示した図である。

【図5】ターゲティングベクターをES細胞に導入して得られた薬剤耐性細胞において、相同組換えが正しく起こっていることを確認したサザンブロット解析の図である。図中、WTはベクター導入のないES細胞の結果を示す。また図中、-/- (レーンNo. 27、35、36) は β geoベクターとHygroベクターの両方で相同組換えを起こしたECAT2遺伝子ホモ変異ES細胞の結果を、 β -geo +/- (レーンNo.78、30、32、33) は β geoベクターで相同組換えを起こしたECAT2遺伝子ヘテロ変異ES細胞の結果を、またhygro +/- (レーン4、7、31、34) はHygroベクターで相同組換えを起こしたECAT2遺伝子ヘテロ変異ES細胞の結果を、それぞれ示す。

【図6】 β geoベクターとHygroベクターの両方で相同組換えを起こしたECAT2遺伝子ホモ変異ES細胞において、ECAT2遺伝子の発現が消失していることを確認したノザンブロット解析の図である。図中、各レーンの説明は図5と同じである。上図はノザンブロット解析の結果を示すオートラジオグラムであり、下図はリボゾーマルRNAをエチジウムブロマイド染色した写真を示す。

【配列表フリーテキスト】

【0156】

配列番号：39に記載の塩基配列はプライマーである。
配列番号：40に記載の塩基配列はプライマーである。
配列番号：41に記載の塩基配列はプライマーである。
配列番号：42に記載の塩基配列はプライマーである。
配列番号：43に記載の塩基配列はプライマーである。
配列番号：44に記載の塩基配列はプライマーである。
配列番号：45に記載の塩基配列はプライマーである。
配列番号：46に記載の塩基配列はプライマーである。
配列番号：47に記載の塩基配列はプライマーである。
配列番号：48に記載の塩基配列はプライマーである。
配列番号：49に記載の塩基配列はプライマーである。
配列番号：50に記載の塩基配列はプライマーである。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Yamanaka, Shinya
Sumitomo Pharmaceuticals Co., Ltd.

<120> Screening method for substances which induce
nuclear reprogramming of somatic cells

<130> 133279

<150> JP 2004-042337

<151> 2004-02-19

<160> 50

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 1623

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220>

<221> CDS

<222> (50)..(1369)

<400> 1

tgactgatct tgagtttgca taggcttcct gcggtgaaac gggtacact atg gcc tct 58
Met Ala Ser
1

ctg aag agg ttt cag acg ctc gtg ccc ctg gat cac aaa caa ggt acc 106
Leu Lys Arg Phe Gln Thr Leu Val Pro Leu Asp His Lys Gln Gly Thr
5 10 15

tta ttt gaa att att gga gag ccc aag ttg ccc aag tgg ttc cat gtc 154
Leu Phe Glu Ile Ile Gly Glu Pro Lys Leu Pro Lys Trp Phe His Val
20 25 30 35

gaa tgc ctg gaa gat cca aaa aga ctg tac gtg gaa cct cgg cta ctg 202
Glu Cys Leu Glu Asp Pro Lys Arg Leu Tyr Val Glu Pro Arg Leu Leu
40 45 50

gaa atc atg ttt ggt aag gat gga gag cac atc cca cat ctt gaa tct 250
Glu Ile Met Phe Gly Lys Asp Gly Glu His Ile Pro His Leu Glu Ser
55 60 65

atg ttg cac acc ctg ata cat gtg aac gtg tgg ggc cct gaa agg cga 298
Met Leu His Thr Leu Ile His Val Asn Val Trp Gly Pro Glu Arg Arg

70	75	80	
gct gag att tgg ata ttc gga ccg ccg cct ttc cga agg gac gtt gac Ala Glu Ile Trp Ile Phe Gly Pro Pro Pro Phe Arg Arg Asp Val Asp 85 90 95			346
cgg atg ctc act gat ctg gct cac tat tgc cgc atg aaa ctg atg gaa Arg Met Leu Thr Asp Leu Ala His Tyr Cys Arg Met Lys Leu Met Glu 100 105 110 115			394
ata gag gct ctg gag gct gga gtt gag cgt cgt cgt atg gcg gcc cat Ile Glu Ala Leu Glu Ala Gly Val Glu Arg Arg Arg Met Ala Ala His 120 125 130			442
aag gct gcc acc cag cct gct ccc gtg aag gtc cgc gag gct gcc cct Lys Ala Ala Thr Gln Pro Ala Pro Val Lys Val Arg Glu Ala Ala Pro 135 140 145			490
cgg ccc gct tcc gtg aag gtc cct gag acg gcc acc cag cct gct ccc Arg Pro Ala Ser Val Lys Val Pro Glu Thr Ala Thr Gln Pro Ala Pro 150 155 160			538
gtg aag gtc cgc gag gct gcc cct cag ccc gct ccg gtg cag gag gtc Val Lys Val Arg Glu Ala Ala Pro Gln Pro Ala Pro Val Gln Glu Val 165 170 175			586
cgc gag gct gcc cct cag cag gct tcc gtg cag gag gag gtc cgc gag Arg Glu Ala Ala Pro Gln Gln Ala Ser Val Gln Glu Glu Val Arg Glu 180 185 190 195			634
gct gcc acc gag cag gct ccc gtg cag gag gtc cgc gag gct gcc acc Ala Ala Thr Glu Gln Ala Pro Val Gln Glu Val Arg Glu Ala Ala Thr 200 205 210			682
gag cag gct ccc gtg cag gag gtc agc gag gct gcc acc gag cag gct Glu Gln Ala Pro Val Gln Glu Val Ser Glu Ala Ala Thr Glu Gln Ala 215 220 225			730
ccc gtg cag gag gtc aac gag gct gcc acc gag cag gct tcc gtg cag Pro Val Gln Glu Val Asn Glu Ala Ala Thr Glu Gln Ala Ser Val Gln 230 235 240			778
gcg gtc cgc gag gct gcc acc cgg ccg gct ccc ggg aag gtc cgc aag Ala Val Arg Glu Ala Ala Thr Arg Pro Ala Pro Gly Lys Val Arg Lys 245 250 255			826
gcg gcc acc cag ccg gct ccg gtg cag gtt tgc cag gag gcc acc cag Ala Ala Thr Gln Pro Ala Pro Val Gln Val Cys Gln Glu Ala Thr Gln 260 265 270 275			874

ttg gct ccc gtg aag gtc cgc gag gcg gcc acc cag ccg gct tcc ggg 922
 Leu Ala Pro Val Lys Val Arg Glu Ala Ala Thr Gln Pro Ala Ser Gly
 280 285 290

aag gtc cgc gag gcg gcc acc cag ttg gct cct gtg aag gtc cgc aag 970
 Lys Val Arg Glu Ala Ala Thr Gln Leu Ala Pro Val Lys Val Arg Lys
 295 300 305

gca gcc acc cag ttg gct cct gtg aag gtc cac gag gcg gcc acc cag 1018
 Ala Ala Thr Gln Leu Ala Pro Val Lys Val His Glu Ala Ala Thr Gln
 310 315 320

ccg gct ccg ggg aag gtc agc gat gct gcc acg cag tcg gct tcg gtg 1066
 Pro Ala Pro Gly Lys Val Ser Asp Ala Ala Thr Gln Ser Ala Ser Val
 325 330 335

cag gtt cgt gag gct gcc acg cag ctg tct ccc gtg gag gcc act gat 1114
 Gln Val Arg Glu Ala Ala Thr Gln Leu Ser Pro Val Glu Ala Thr Asp
 340 345 350 355

act agc cag ttg gct cag gtg aag gct gat gaa gcc ttt gcc cag cac 1162
 Thr Ser Gln Leu Ala Gln Val Lys Ala Asp Glu Ala Phe Ala Gln His
 360 365 370

act tca ggg gag gcc cac cag gtt gcc aat ggg cag tct ccc att gaa 1210
 Thr Ser Gly Glu Ala His Gln Val Ala Asn Gly Gln Ser Pro Ile Glu
 375 380 385

gtc tgt gag act gcc acc ggg cag cat tct cta gat gtc tct agg gcc 1258
 Val Cys Glu Thr Ala Thr Gly Gln His Ser Leu Asp Val Ser Arg Ala
 390 395 400

ttg tcc cag aag tgt cct gag gtt ttt gag tgg gag acc cag agt tgt 1306
 Leu Ser Gln Lys Cys Pro Glu Val Phe Glu Trp Glu Thr Gln Ser Cys
 405 410 415

ttg gat ggc agc tat gtc ata gtt cag cct cca agg gat gcc tgg gaa 1354
 Leu Asp Gly Ser Tyr Val Ile Val Gln Pro Pro Arg Asp Ala Trp Glu
 420 425 430 435

tca ttt atc ata tta taaatgcac tctggtgtga gccaggatag atggtacacg 1409
 Ser Phe Ile Ile Leu
 440

tctgcaaatc cagaacctaa aggcaggggt tagcttgggc tgagtaaggc aatgatctta 1469

aacctcagcc tgcctaagac tcccttcac tttctttctg gtttttgccc taggaatcgg 1529

gaagaacaga gtagagctgt ttttgtttcc ccattgtgtt aaatgtttgc agacacaatt 1589

taaagtattc taataaaaaa aaaattgcat tccc

1623

<210> 2

<211> 440

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 2

Met Ala Ser Leu Lys Arg Phe Gln Thr Leu Val Pro Leu Asp His Lys
1 5 10 15

Gln Gly Thr Leu Phe Glu Ile Ile Gly Glu Pro Lys Leu Pro Lys Trp
20 25 30

Phe His Val Glu Cys Leu Glu Asp Pro Lys Arg Leu Tyr Val Glu Pro
35 40 45

Arg Leu Leu Glu Ile Met Phe Gly Lys Asp Gly Glu His Ile Pro His
50 55 60

Leu Glu Ser Met Leu His Thr Leu Ile His Val Asn Val Trp Gly Pro
65 70 75 80

Glu Arg Arg Ala Glu Ile Trp Ile Phe Gly Pro Pro Pro Phe Arg Arg
85 90 95

Asp Val Asp Arg Met Leu Thr Asp Leu Ala His Tyr Cys Arg Met Lys
100 105 110

Leu Met Glu Ile Glu Ala Leu Glu Ala Gly Val Glu Arg Arg Arg Met
115 120 125

Ala Ala His Lys Ala Ala Thr Gln Pro Ala Pro Val Lys Val Arg Glu
130 135 140

Ala Ala Pro Arg Pro Ala Ser Val Lys Val Pro Glu Thr Ala Thr Gln
145 150 155 160

Pro Ala Pro Val Lys Val Arg Glu Ala Ala Pro Gln Pro Ala Pro Val
165 170 175

Gln Glu Val Arg Glu Ala Ala Pro Gln Gln Ala Ser Val Gln Glu Glu
180 185 190

Val Arg Glu Ala Ala Thr Glu Gln Ala Pro Val Gln Glu Val Arg Glu
195 200 205

Ala Ala Thr Glu Gln Ala Pro Val Gln Glu Val Ser Glu Ala Ala Thr
210 215 220

Glu Gln Ala Pro Val Gln Glu Val Asn Glu Ala Ala Thr Glu Gln Ala
225 230 235 240

Ser Val Gln Ala Val Arg Glu Ala Ala Thr Arg Pro Ala Pro Gly Lys
245 250 255

Val Arg Lys Ala Ala Thr Gln Pro Ala Pro Val Gln Val Cys Gln Glu
260 265 270

Ala Thr Gln Leu Ala Pro Val Lys Val Arg Glu Ala Ala Thr Gln Pro
275 280 285

Ala Ser Gly Lys Val Arg Glu Ala Ala Thr Gln Leu Ala Pro Val Lys
290 295 300

Val Arg Lys Ala Ala Thr Gln Leu Ala Pro Val Lys Val His Glu Ala
305 310 315 320

Ala Thr Gln Pro Ala Pro Gly Lys Val Ser Asp Ala Ala Thr Gln Ser
325 330 335

Ala Ser Val Gln Val Arg Glu Ala Ala Thr Gln Leu Ser Pro Val Glu
340 345 350

Ala Thr Asp Thr Ser Gln Leu Ala Gln Val Lys Ala Asp Glu Ala Phe
355 360 365

Ala Gln His Thr Ser Gly Glu Ala His Gln Val Ala Asn Gly Gln Ser
370 375 380

Pro Ile Glu Val Cys Glu Thr Ala Thr Gly Gln His Ser Leu Asp Val
385 390 395 400

Ser Arg Ala Leu Ser Gln Lys Cys Pro Glu Val Phe Glu Trp Glu Thr
405 410 415

Gln Ser Cys Leu Asp Gly Ser Tyr Val Ile Val Gln Pro Pro Arg Asp
420 425 430

Ala Trp Glu Ser Phe Ile Ile Leu
435 440

<210> 3

<211> 1063

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (54)..(704)

<400> 3

tcggcctttg ggtttgctgt ggtgtccttg tctcctgcag gaccggccgc agc atg	56
Met	
1	
 gac gct ccc agg cgg ttt ccg acg ctc gtg caa ctg atg cag cca aaa	104
Asp Ala Pro Arg Arg Phe Pro Thr Leu Val Gln Leu Met Gln Pro Lys	
5 10 15	
 gca atg cca gtg gag gtg ctc ggt cac ctc cct aag cgg ttc tcc tgg	152
Ala Met Pro Val Glu Val Leu Gly His Leu Pro Lys Arg Phe Ser Trp	
20 25 30	
 ttc cac tct gag ttc ctg aag aat ccg aag gta gtt cgc ctt gag gtt	200
Phe His Ser Glu Phe Leu Lys Asn Pro Lys Val Val Arg Leu Glu Val	
35 40 45	
 tgg ctg gtg gaa aag atc ttc ggc cgg ggc gga gaa cgc atc ccg cac	248
Trp Leu Val Glu Lys Ile Phe Gly Arg Gly Gly Glu Arg Ile Pro His	
50 55 60 65	
 gtc cag ggt atg tcc caa atc ttg att cac gtg aat cga ttg gac cct	296
Val Gln Gly Met Ser Gln Ile Leu Ile His Val Asn Arg Leu Asp Pro	
70 75 80	
 aac ggc gag gct gag atc ttg gta ttt ggg agg cct tct tac cag gag	344
Asn Gly Glu Ala Glu Ile Leu Val Phe Gly Arg Pro Ser Tyr Gln Glu	
85 90 95	
 gac aca atc aag atg atc atg aac ctg gct gac tat cac cgc cag ctc	392
Asp Thr Ile Lys Met Ile Met Asn Leu Ala Asp Tyr His Arg Gln Leu	
100 105 110	
 cag gcg aaa ggc tca gga aag gcc ctc gcc cag gat gtc gcc act cag	440
Gln Ala Lys Gly Ser Gly Lys Ala Leu Ala Gln Asp Val Ala Thr Gln	
115 120 125	
 aag gcc gag acc cag cgg tct tca ata gaa gtc cgg gag gcc ggg acg	488
Lys Ala Glu Thr Gln Arg Ser Ser Ile Glu Val Arg Glu Ala Gly Thr	
130 135 140 145	
 cag cgt tcg gtg gag gtc cgg gag gcc ggg acc cag cgt tcg gtg gaa	536
Gln Arg Ser Val Glu Val Arg Glu Ala Gly Thr Gln Arg Ser Val Glu	
150 155 160	
 gtc cag gag gtc ggg aca cag ggt tct ccg gtg gag gtg cag gag gcc	584

Val Gln Glu Val Gly Thr Gln Gly Ser Pro Val Glu Val Gln Glu Ala
 165 170 175

ggg acc cag cag tct ctc cag gct gcc aac aag tcg ggg acc cag cga 632
 Gly Thr Gln Gln Ser Leu Gln Ala Ala Asn Lys Ser Gly Thr Gln Arg
 180 185 190

tcc ccc gaa gct gcc agc aag gca gtg acc cag cgg ttt cgc gag gat 680
 Ser Pro Glu Ala Ala Ser Lys Ala Val Thr Gln Arg Phe Arg Glu Asp
 195 200 205

gcc cgg gac cca gtt act aga tta tgaaggcatc tcaggccctg gagccagagc 734
 Ala Arg Asp Pro Val Thr Arg Leu
 210 215

cagtcagggg ttaaagtgaag agcccgtatt tccgccccaga agctgggggtt ggggagagga 794

tgtggatttt ttgttttacc ctttctgttg catgggttgca aacacaaact tgagtcttaa 854

taaagaattg caaagtggaa gcccgcctcc cccctccccc ccgcctccct taagtccagg 914

aagctgggggt ggcgaggaag gatgatgtgg attgtttttg ttttaccctt tttgttgaat 974

ggttgccaac ccaaacttga gttttaataa ataattgcct ttccaaaaaa aaaaaaaaaa 1034

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1063

<210> 4

<211> 217

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Met Asp Ala Pro Arg Arg Phe Pro Thr Leu Val Gln Leu Met Gln Pro
 1 5 10 15

Lys Ala Met Pro Val Glu Val Leu Gly His Leu Pro Lys Arg Phe Ser
 20 25 30

Trp Phe His Ser Glu Phe Leu Lys Asn Pro Lys Val Val Arg Leu Glu
 35 40 45

Val Trp Leu Val Glu Lys Ile Phe Gly Arg Gly Gly Glu Arg Ile Pro
 50 55 60

His Val Gln Gly Met Ser Gln Ile Leu Ile His Val Asn Arg Leu Asp
 65 70 75 80

Pro Asn Gly Glu Ala Glu Ile Leu Val Phe Gly Arg Pro Ser Tyr Gln

85	90	95
Glu Asp Thr Ile Lys Met Ile Met Asn Leu Ala Asp Tyr His Arg Gln		
100	105	110
Leu Gln Ala Lys Gly Ser Gly Lys Ala Leu Ala Gln Asp Val Ala Thr		
115	120	125
Gln Lys Ala Glu Thr Gln Arg Ser Ser Ile Glu Val Arg Glu Ala Gly		
130	135	140
Thr Gln Arg Ser Val Glu Val Arg Glu Ala Gly Thr Gln Arg Ser Val		
145	150	155
Glu Val Gln Glu Val Gly Thr Gln Gly Ser Pro Val Glu Val Gln Glu		
165	170	175
Ala Gly Thr Gln Gln Ser Leu Gln Ala Ala Asn Lys Ser Gly Thr Gln		
180	185	190
Arg Ser Pro Glu Ala Ala Ser Lys Ala Val Thr Gln Arg Phe Arg Glu		
195	200	205
Asp Ala Arg Asp Pro Val Thr Arg Leu		
210	215	

<210> 5
 <211> 591
 <212> DNA
 <213> Mus musculus

<220>
 <221> CDS
 <222> (59)..(412)

<400> 5
 gccgtgcgtg gtggataagc ttgatctcgt cttccctgaa gtctggttcc ttggcagg 58

 atg atg gtg acc ctc gtg acc cgt aaa gat atc ccc ccg tgg gtg aaa 106
 Met Met Val Thr Leu Val Thr Arg Lys Asp Ile Pro Pro Trp Val Lys
 1 5 10 15

 gtt cct gaa gac ctg aaa gat cca gaa gta ttc cag gtc cag tcg ctg 154
 Val Pro Glu Asp Leu Lys Asp Pro Glu Val Phe Gln Val Gln Ser Leu
 20 25 30

 gtg ctg aaa tat ctg ttt ggc cca cag gga tct cga atg tct cac atc 202
 Val Leu Lys Tyr Leu Phe Gly Pro Gln Gly Ser Arg Met Ser His Ile

35 40 45
 gag cag gtg agc cag gcc atg ttt gag ctg aag aac ctg gaa tct ccc 250
 Glu Gln Val Ser Gln Ala Met Phe Glu Leu Lys Asn Leu Glu Ser Pro
 50 55 60
 gaa gaa ctt atc gag gtc ttc att tac ggc tct caa aac aac aag att 298
 Glu Glu Leu Ile Glu Val Phe Ile Tyr Gly Ser Gln Asn Asn Lys Ile
 65 70 75 80
 cgg gct aaa tgg atg ctt cag tcc atg gct gag agg tac cac ctg cgc 346
 Arg Ala Lys Trp Met Leu Gln Ser Met Ala Glu Arg Tyr His Leu Arg
 85 90 95
 cag caa aaa gga gtg ctg aag ctg gag gaa tcc atg aag acc ctg gag 394
 Gln Gln Lys Gly Val Leu Lys Leu Glu Glu Ser Met Lys Thr Leu Glu
 100 105 110
 cta ggc cag tgt atc gag tgaagccagt ttccagtcct tgtgtctccg 442
 Leu Gly Gln Cys Ile Glu
 115
 acctggatgc aggttaagct gtggccagt tttggttctg gcgggatatt tagctttgtt 502
 acatcctagc aagatattct ggatccctgc tgcgcattct gatgtgaatc ccaaggttac 562
 cactctaaat aaaaaataaa attgaagtg 591

<210> 6
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 6
 Met Met Val Thr Leu Val Thr Arg Lys Asp Ile Pro Pro Trp Val Lys
 1 5 10 15
 Val Pro Glu Asp Leu Lys Asp Pro Glu Val Phe Gln Val Gln Ser Leu
 20 25 30
 Val Leu Lys Tyr Leu Phe Gly Pro Gln Gly Ser Arg Met Ser His Ile
 35 40 45
 Glu Gln Val Ser Gln Ala Met Phe Glu Leu Lys Asn Leu Glu Ser Pro
 50 55 60
 Glu Glu Leu Ile Glu Val Phe Ile Tyr Gly Ser Gln Asn Asn Lys Ile
 65 70 75 80

Arg Ala Lys Trp Met Leu Gln Ser Met Ala Glu Arg Tyr His Leu Arg
85 90 95

Gln Gln Lys Gly Val Leu Lys Leu Glu Glu Ser Met Lys Thr Leu Glu
100 105 110

Leu Gly Gln Cys Ile Glu
115

<210> 7
<211> 640
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (15)..(362)

<400> 7
ggcacgagga taag atg gga act ctc ccg gca cgt aga cat atc ccg ccg 50
Met Gly Thr Leu Pro Ala Arg Arg His Ile Pro Pro
1 5 10
tgg gtg aaa gtt ccc gaa gac ctg aaa gat cca gag gtg ttc cag gtc 98
Trp Val Lys Val Pro Glu Asp Leu Lys Asp Pro Glu Val Phe Gln Val
15 20 25
cag acg cgg ctg ctg aaa gcc att ttc ggc ccg gac gga tct cga atc 146
Gln Thr Arg Leu Leu Lys Ala Ile Phe Gly Pro Asp Gly Ser Arg Ile
30 35 40
cct tac atc gag cag gtg agc aag gcc atg ctc gag ctg aag gct ctg 194
Pro Tyr Ile Glu Gln Val Ser Lys Ala Met Leu Glu Leu Lys Ala Leu
45 50 55 60
gag tct tca gac ctc acc gag gtc gtg gtt tac ggc tcc tat ttg tac 242
Glu Ser Ser Asp Leu Thr Glu Val Val Val Tyr Gly Ser Tyr Leu Tyr
65 70 75
aag ctc cgg acc aag tgg atg ctc cag tcc atg gct gag tgg cac cgc 290
Lys Leu Arg Thr Lys Trp Met Leu Gln Ser Met Ala Glu Trp His Arg
80 85 90
cag cgc cag gag cga ggg atg ctc aaa ctt gcc gaa gcc atg aat gcc 338
Gln Arg Gln Glu Arg Gly Met Leu Lys Leu Ala Glu Ala Met Asn Ala
95 100 105
ctc gaa cta ggc cct tgg atg aag tgaaccagtt tccagccaat gcaatgaagc 392

Leu Glu Leu Gly Pro Trp Met Lys
110 115

cgggttgcag agattagggt gtggccagag ctagagtgat tccttaagct tgttttaaaa 452
tctgctccag cctaaagagt taagggaata ccatttggtc ccttaaagag ttaagggaata 512
acccttggct ctgagtcttg ttgtgaatat ttctttgatg attgttaata aaaagtgttt 572
tttctttttt cccattttta aaaataacaa taaagtttta aataagttga taaaaaaaaa 632
aaaaaaaaa 640

<210> 8
<211> 116
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 8
Met Gly Thr Leu Pro Ala Arg Arg His Ile Pro Pro Trp Val Lys Val
1 5 10 15
Pro Glu Asp Leu Lys Asp Pro Glu Val Phe Gln Val Gln Thr Arg Leu
20 25 30
Leu Lys Ala Ile Phe Gly Pro Asp Gly Ser Arg Ile Pro Tyr Ile Glu
35 40 45
Gln Val Ser Lys Ala Met Leu Glu Leu Lys Ala Leu Glu Ser Ser Asp
50 55 60
Leu Thr Glu Val Val Val Tyr Gly Ser Tyr Leu Tyr Lys Leu Arg Thr
65 70 75 80
Lys Trp Met Leu Gln Ser Met Ala Glu Trp His Arg Gln Arg Gln Glu
85 90 95
Arg Gly Met Leu Lys Leu Ala Glu Ala Met Asn Ala Leu Glu Leu Gly
100 105 110
Pro Trp Met Lys
115

<210> 9
<211> 1670
<212> DNA
<213> Mus musculus

<220>

<221> CDS

<222> (134)..(1567)

<400> 9

acttgccctgt ccaagatctg ttggaatctg ctctctacaga agaccagctg aaacaaatag 60

cttcgtggga ctgagcacia ctactagatt cttggacttc cgttcacagc tgccaattgt 120

tgggagtaca ata atg gag gag tcg gaa ttg gag att ttt aga agt aag 169

Met Glu Glu Ser Glu Leu Glu Ile Phe Arg Ser Lys
1 5 10

ttt gtt aga ggc tca tct gtc acg aag cag cat gcc tgg cga aac cag 217

Phe Val Arg Gly Ser Ser Val Thr Lys Gln His Ala Trp Arg Asn Gln
15 20 25

cac agc gag aag cgt tgc tct tcc tcc atc agt tct ata tcc ctg gac 265

His Ser Glu Lys Arg Cys Ser Ser Ser Ile Ser Ser Ile Ser Leu Asp
30 35 40

aga atg cca tcg gaa atc ttg gtg aag ata ctt tct tac ttg gat gcg 313

Arg Met Pro Ser Glu Ile Leu Val Lys Ile Leu Ser Tyr Leu Asp Ala
45 50 55 60

gtg acc ttg gtg tgc att gga tgt gtg agc aga cgc ttt tat cat ttg 361

Val Thr Leu Val Cys Ile Gly Cys Val Ser Arg Arg Phe Tyr His Leu
65 70 75

gct gat gac aat ctt att tgg gtc agg aag tac gca gct gca ttt aga 409

Ala Asp Asp Asn Leu Ile Trp Val Arg Lys Tyr Ala Ala Ala Phe Arg
80 85 90

tca aaa aga tca cgt tgg aaa gct act tca gtg gag gaa aca gcc aca 457

Ser Lys Arg Ser Arg Trp Lys Ala Thr Ser Val Glu Glu Thr Ala Thr
95 100 105

agt ctg agc ttg ctg tca gtt tgg gat aaa gaa gat gga tac tgg aag 505

Ser Leu Ser Leu Leu Ser Val Trp Asp Lys Glu Asp Gly Tyr Trp Lys
110 115 120

aaa gaa tat att aca aag cag atc tca tct gtg aga gca gcc ctc acc 553

Lys Glu Tyr Ile Thr Lys Gln Ile Ser Ser Val Arg Ala Ala Leu Thr
125 130 135 140

aac agc ctc agt cct gtc aaa cgc cgc aca agc ctt cct tcg aaa acc 601

Asn Ser Leu Ser Pro Val Lys Arg Arg Thr Ser Leu Pro Ser Lys Thr
145 150 155

aaa gag tcc ctc aga ata tct ggc tta ggt tgg aca atc atc tta aga 649
 Lys Glu Ser Leu Arg Ile Ser Gly Leu Gly Trp Thr Ile Ile Leu Arg
 160 165 170

gaa gcc agt ggc aaa gaa cac atc atg cag cat tcg aat ctt tcc gta 697
 Glu Ala Ser Gly Lys Glu His Ile Met Gln His Ser Asn Leu Ser Val
 175 180 185

aat gac aac tct gtc act gtt ttt tgg cat gac aaa aat tgg cca cat 745
 Asn Asp Asn Ser Val Thr Val Phe Trp His Asp Lys Asn Trp Pro His
 190 195 200

gta gac acg ttg tcc acc ctg gat ttg tat ggt gcc aca cca att ttt 793
 Val Asp Thr Leu Ser Thr Leu Asp Leu Tyr Gly Ala Thr Pro Ile Phe
 205 210 215 220

atg gag cag tat aaa ggc cct aac aca agt tgt cca cga tgg ctg tct 841
 Met Glu Gln Tyr Lys Gly Pro Asn Thr Ser Cys Pro Arg Trp Leu Ser
 225 230 235

tta att gaa aag tac gat ctg agt aat tta cgc aag tct gct atg att 889
 Leu Ile Glu Lys Tyr Asp Leu Ser Asn Leu Arg Lys Ser Ala Met Ile
 240 245 250

ggc tgc gac aga cat gtt cgg gta ttc tgt gta aat cct ggc ctc ctg 937
 Gly Cys Asp Arg His Val Arg Val Phe Cys Val Asn Pro Gly Leu Leu
 255 260 265

gtg ggg ctg tgg cag gag aat ggt gga cta gct ttt gtc atg gca aat 985
 Val Gly Leu Trp Gln Glu Asn Gly Gly Leu Ala Phe Val Met Ala Asn
 270 275 280

att cat tcc cat ggc ctt ttc gag aga agc ata atg ggc tca gac act 1033
 Ile His Ser His Gly Leu Phe Glu Arg Ser Ile Met Gly Ser Asp Thr
 285 290 295 300

att ccc tat aca ttg cct ccc gac act aca ttt gtg gat aac tac cca 1081
 Ile Pro Tyr Thr Leu Pro Pro Asp Thr Thr Phe Val Asp Asn Tyr Pro
 305 310 315

gac tca atg acc ttt tat gga gat aaa ggc ttt cag ctg cat atc gac 1129
 Asp Ser Met Thr Phe Tyr Gly Asp Lys Gly Phe Gln Leu His Ile Asp
 320 325 330

att cat ggc agt aag act tac ttc ctg tgt agc acc ttc cac aat ctc 1177
 Ile His Gly Ser Lys Thr Tyr Phe Leu Cys Ser Thr Phe His Asn Leu
 335 340 345

ttc tgc agg aga gcg ggc att aac aat gga tat gtg aag ttc ttg atg 1225
 Phe Cys Arg Arg Ala Gly Ile Asn Asn Gly Tyr Val Lys Phe Leu Met

350 355 360
 ata aac tta aaa aat aac aga gaa cac cta cct ctt gtt gga aaa gtt 1273
 Ile Asn Leu Lys Asn Asn Arg Glu His Leu Pro Leu Val Gly Lys Val
 365 370 375 380
 ggc ctt gaa tgg aga act gac tgt tta aat ggc cgt att gag agt tgc 1321
 Gly Leu Glu Trp Arg Thr Asp Cys Leu Asn Gly Arg Ile Glu Ser Cys
 385 390 395
 att gta gtg gat atg acc ttg ctg gat gag gac aag aag ccc atc tgg 1369
 Ile Val Val Asp Met Thr Leu Leu Asp Glu Asp Lys Lys Pro Ile Trp
 400 405 410
 tat gtg agt tct cca gtg tgc ttg aga tct gcc tgc ctt cct gat ttc 1417
 Tyr Val Ser Ser Pro Val Cys Leu Arg Ser Ala Cys Leu Pro Asp Phe
 415 420 425
 ccg cag ccg gct tac tct ttc gag tac atg gac agc gta gga gga gtg 1465
 Pro Gln Pro Ala Tyr Ser Phe Glu Tyr Met Asp Ser Val Gly Gly Val
 430 435 440
 tgc gca gac cta ggg tgg ttt gaa aat acc gat gaa tac ttc att gtc 1513
 Cys Ala Asp Leu Gly Trp Phe Glu Asn Thr Asp Glu Tyr Phe Ile Val
 445 450 455 460
 aga ctg gac att tac ctc agt gta gca aaa tta caa caa tgg ttt ggg 1561
 Arg Leu Asp Ile Tyr Leu Ser Val Ala Lys Leu Gln Gln Trp Phe Gly
 465 470 475
 agg caa taaatgctga gtttagcagta gggagtcttg ttattagtaa gctgtttgtt 1617
 Arg Gln
 ttttacaact ttgtttttat tgaaagttaa aataaagcat atttgttgta ttc 1670

<210> 10

<211> 478

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 10

Met Glu Glu Ser Glu Leu Glu Ile Phe Arg Ser Lys Phe Val Arg Gly
 1 5 10 15

Ser Ser Val Thr Lys Gln His Ala Trp Arg Asn Gln His Ser Glu Lys
 20 25 30

Arg Cys Ser Ser Ser Ile Ser Ser Ile Ser Leu Asp Arg Met Pro Ser
 35 40 45

Glu Ile Leu Val Lys Ile Leu Ser Tyr Leu Asp Ala Val Thr Leu Val
 50 55 60
 Cys Ile Gly Cys Val Ser Arg Arg Phe Tyr His Leu Ala Asp Asp Asn
 65 70 75 80
 Leu Ile Trp Val Arg Lys Tyr Ala Ala Ala Phe Arg Ser Lys Arg Ser
 85 90 95
 Arg Trp Lys Ala Thr Ser Val Glu Glu Thr Ala Thr Ser Leu Ser Leu
 100 105 110
 Leu Ser Val Trp Asp Lys Glu Asp Gly Tyr Trp Lys Lys Glu Tyr Ile
 115 120 125
 Thr Lys Gln Ile Ser Ser Val Arg Ala Ala Leu Thr Asn Ser Leu Ser
 130 135 140
 Pro Val Lys Arg Arg Thr Ser Leu Pro Ser Lys Thr Lys Glu Ser Leu
 145 150 155 160
 Arg Ile Ser Gly Leu Gly Trp Thr Ile Ile Leu Arg Glu Ala Ser Gly
 165 170 175
 Lys Glu His Ile Met Gln His Ser Asn Leu Ser Val Asn Asp Asn Ser
 180 185 190
 Val Thr Val Phe Trp His Asp Lys Asn Trp Pro His Val Asp Thr Leu
 195 200 205
 Ser Thr Leu Asp Leu Tyr Gly Ala Thr Pro Ile Phe Met Glu Gln Tyr
 210 215 220
 Lys Gly Pro Asn Thr Ser Cys Pro Arg Trp Leu Ser Leu Ile Glu Lys
 225 230 235 240
 Tyr Asp Leu Ser Asn Leu Arg Lys Ser Ala Met Ile Gly Cys Asp Arg
 245 250 255
 His Val Arg Val Phe Cys Val Asn Pro Gly Leu Leu Val Gly Leu Trp
 260 265 270
 Gln Glu Asn Gly Gly Leu Ala Phe Val Met Ala Asn Ile His Ser His
 275 280 285
 Gly Leu Phe Glu Arg Ser Ile Met Gly Ser Asp Thr Ile Pro Tyr Thr
 290 295 300
 Leu Pro Pro Asp Thr Thr Phe Val Asp Asn Tyr Pro Asp Ser Met Thr

305		310		315		320
Phe Tyr Gly Asp Lys Gly Phe Gln Leu His Ile Asp Ile His Gly Ser						
		325		330		335
Lys Thr Tyr Phe Leu Cys Ser Thr Phe His Asn Leu Phe Cys Arg Arg						
		340		345		350
Ala Gly Ile Asn Asn Gly Tyr Val Lys Phe Leu Met Ile Asn Leu Lys						
		355		360		365
Asn Asn Arg Glu His Leu Pro Leu Val Gly Lys Val Gly Leu Glu Trp						
		370		375		380
Arg Thr Asp Cys Leu Asn Gly Arg Ile Glu Ser Cys Ile Val Val Asp						
385		390		395		400
Met Thr Leu Leu Asp Glu Asp Lys Lys Pro Ile Trp Tyr Val Ser Ser						
		405		410		415
Pro Val Cys Leu Arg Ser Ala Cys Leu Pro Asp Phe Pro Gln Pro Ala						
		420		425		430
Tyr Ser Phe Glu Tyr Met Asp Ser Val Gly Gly Val Cys Ala Asp Leu						
		435		440		445
Gly Trp Phe Glu Asn Thr Asp Glu Tyr Phe Ile Val Arg Leu Asp Ile						
		450		455		460
Tyr Leu Ser Val Ala Lys Leu Gln Gln Trp Phe Gly Arg Gln						
465		470		475		

<210> 11
 <211> 1665
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (21)..(1550)

<400> 11
 aggggtgaact ccttgtctct atg gcg act gga cgc ggt cgg atc ttg cag cag 53
 Met Ala Thr Gly Arg Gly Arg Ile Leu Gln Gln
 1 5 10

cac tgg ctc ggc ctc cag acg ctg cgc ggg ccc agc agg ggc ggt ggc 101
 His Trp Leu Gly Leu Gln Thr Leu Arg Gly Pro Ser Arg Gly Gly Gly

15	20	25	
gcg gcc cgg ggg cgc gcc agg gcc ttt ggg tgc aga aag ggg cca ggg Ala Ala Arg Gly Arg Ala Arg Ala Phe Gly Cys Arg Lys Gly Pro Gly 30 35 40			149
gtc aag ctt tct gca ggc tct gct gcc ctg agg tgc cat gcc gga ggt Val Lys Leu Ser Ala Gly Ser Ala Ala Leu Arg Cys His Ala Gly Gly 45 50 55			197
gga cag cac tgg gag agc tct ttc tcc tgc tgt tct ggg ttc ctg gat Gly Gln His Trp Glu Ser Ser Phe Ser Cys Cys Ser Gly Phe Leu Asp 60 65 70 75			245
gga atg cct tca gaa atc ttg ctg aag ata ttt tcc tac ttg gat gct Gly Met Pro Ser Glu Ile Leu Leu Lys Ile Phe Ser Tyr Leu Asp Ala 80 85 90			293
gtg agc ctt ctg tgt act gga tgt gtg agc agg cgc ttt tat cat cta Val Ser Leu Leu Cys Thr Gly Cys Val Ser Arg Arg Phe Tyr His Leu 95 100 105			341
gcc aat gac aat ttt att tgg atc gga atc tac tca act gct ttt tca Ala Asn Asp Asn Phe Ile Trp Ile Gly Ile Tyr Ser Thr Ala Phe Ser 110 115 120			389
cct gca aga tca aat tgg aaa ttt aat tca gta gag aag ata gct atg Pro Ala Arg Ser Asn Trp Lys Phe Asn Ser Val Glu Lys Ile Ala Met 125 130 135			437
tct atg agc ttt ctg tca gtt cag gat aaa gaa gct ggt tat tgg aag Ser Met Ser Phe Leu Ser Val Gln Asp Lys Glu Ala Gly Tyr Trp Lys 140 145 150 155			485
aaa gaa tat atc aca aaa caa ata gca tct gta aaa gcc gca cta gct Lys Glu Tyr Ile Thr Lys Gln Ile Ala Ser Val Lys Ala Ala Leu Ala 160 165 170			533
gac att ctc aaa cct gtc aac cct tac aca ggc ctt cca gtt aag acc Asp Ile Leu Lys Pro Val Asn Pro Tyr Thr Gly Leu Pro Val Lys Thr 175 180 185			581
aaa gag gcc ctc aga ata ttt ggt tta ggt tgg gca att ata ctg aaa Lys Glu Ala Leu Arg Ile Phe Gly Leu Gly Trp Ala Ile Ile Leu Lys 190 195 200			629
gaa aaa ggt gga aaa gaa tat atc atg gag cat gtt gat ctt tcc ata Glu Lys Gly Gly Lys Glu Tyr Ile Met Glu His Val Asp Leu Ser Ile 205 210 215			677

aat gac aca tca gtt act gtt ata tgg tat ggc aaa aaa tgg cca tgc	725
Asn Asp Thr Ser Val Thr Val Ile Trp Tyr Gly Lys Lys Trp Pro Cys	
220 225 230 235	
cta gca tca ttg tca acc tta gat tta tgt ggc atg aca cca gtt ttt	773
Leu Ala Ser Leu Ser Thr Leu Asp Leu Cys Gly Met Thr Pro Val Phe	
240 245 250	
acc gac tgg tat aaa act ccc acc aaa cat aga ctc cga tgg cat tct	821
Thr Asp Trp Tyr Lys Thr Pro Thr Lys His Arg Leu Arg Trp His Ser	
255 260 265	
tta att gca aag tac aat ctg agt cat ttg acc ata tct acc atg att	869
Leu Ile Ala Lys Tyr Asn Leu Ser His Leu Thr Ile Ser Thr Met Ile	
270 275 280	
ggc tgt gac aga ctc att cgg atc ttc tgc ctg cac cct ggc ctc ctg	917
Gly Cys Asp Arg Leu Ile Arg Ile Phe Cys Leu His Pro Gly Leu Leu	
285 290 295	
gtg gga gtg tgg aag aag gag gaa gaa ctg gct ttt gtt atg gca aat	965
Val Gly Val Trp Lys Lys Glu Glu Glu Leu Ala Phe Val Met Ala Asn	
300 305 310 315	
ctt cat ttt cat cac ctt gtg gag agg agc aca tta ggc tcg gct act	1013
Leu His Phe His His Leu Val Glu Arg Ser Thr Leu Gly Ser Ala Thr	
320 325 330	
atc ccc tat gaa ctg cct cca cat agc ccc ttt ttg gat gat agc ccc	1061
Ile Pro Tyr Glu Leu Pro Pro His Ser Pro Phe Leu Asp Asp Ser Pro	
335 340 345	
gag tat gga ctg cac ggc tac caa ctc cat gtt gat ctg cac agc ggt	1109
Glu Tyr Gly Leu His Gly Tyr Gln Leu His Val Asp Leu His Ser Gly	
350 355 360	
ggg gtt ttc tac cta tgt ggt aca ttt cgc aat ctc ttc acc aag aga	1157
Gly Val Phe Tyr Leu Cys Gly Thr Phe Arg Asn Leu Phe Thr Lys Arg	
365 370 375	
gga aat att gaa aat gga cat gtg aag ctc att gtt ata cat tta aaa	1205
Gly Asn Ile Glu Asn Gly His Val Lys Leu Ile Val Ile His Leu Lys	
380 385 390 395	
aat aac aga gaa cac cta cct ctt att gga aaa gtt ggc ctc tcg tgg	1253
Asn Asn Arg Glu His Leu Pro Leu Ile Gly Lys Val Gly Leu Ser Trp	
400 405 410	
aaa act gat att ttt gat ggc tgt ata aag agt tgt tcc atg atg gac	1301
Lys Thr Asp Ile Phe Asp Gly Cys Ile Lys Ser Cys Ser Met Met Asp	

415	420	425	
gta act ctt ttg gat gaa cat ggg aaa ccc ttt tgg tgt ttc agt tcc			1349
Val Thr Leu Leu Asp Glu His Gly Lys Pro Phe Trp Cys Phe Ser Ser			
430	435	440	
ccg gtg tgc ctg aga tcg cct gcc aca ccc tct gac agc tct agc ttc			1397
Pro Val Cys Leu Arg Ser Pro Ala Thr Pro Ser Asp Ser Ser Ser Phe			
445	450	455	
ttg gga cag aca tac aac gtg gac tac gtt gat gcg gaa gga aga gtg			1445
Leu Gly Gln Thr Tyr Asn Val Asp Tyr Val Asp Ala Glu Gly Arg Val			
460	465	470	475
cac gtg gag ctg gtg tgg atc aga gag acc gaa gaa tac ctt att gtc			1493
His Val Glu Leu Val Trp Ile Arg Glu Thr Glu Glu Tyr Leu Ile Val			
480	485	490	
aac ctg gtc ctt tat ctt agt atc gca aaa atc aac cat tgg ttt ggg			1541
Asn Leu Val Leu Tyr Leu Ser Ile Ala Lys Ile Asn His Trp Phe Gly			
495	500	505	
act gaa tat tagcagtagg tggcaaatta ttgttgttat ttagttgttt			1590
Thr Glu Tyr			
510			
atttttgact ggctttgttc ttggtgttga aaattaaaat aaagcaaadc tgcaaaaaaa			1650
aaaaaaaaa aaaaa			1665

<210> 12
 <211> 510
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 12
 Met Ala Thr Gly Arg Gly Arg Ile Leu Gln Gln His Trp Leu Gly Leu
 1 5 10 15
 Gln Thr Leu Arg Gly Pro Ser Arg Gly Gly Gly Ala Ala Arg Gly Arg
 20 25 30
 Ala Arg Ala Phe Gly Cys Arg Lys Gly Pro Gly Val Lys Leu Ser Ala
 35 40 45
 Gly Ser Ala Ala Leu Arg Cys His Ala Gly Gly Gly Gln His Trp Glu
 50 55 60

Ser Ser Phe Ser Cys Cys Ser Gly Phe Leu Asp Gly Met Pro Ser Glu

65	70	75	80
Ile Leu Leu Lys	Ile Phe Ser Tyr Leu Asp Ala Val Ser Leu Leu Cys		
	85	90	95
Thr Gly Cys Val Ser Arg Arg Phe Tyr His Leu Ala Asn Asp Asn Phe			
	100	105	110
Ile Trp Ile Gly Ile Tyr Ser Thr Ala Phe Ser Pro Ala Arg Ser Asn			
	115	120	125
Trp Lys Phe Asn Ser Val Glu Lys Ile Ala Met Ser Met Ser Phe Leu			
	130	135	140
Ser Val Gln Asp Lys Glu Ala Gly Tyr Trp Lys Lys Glu Tyr Ile Thr			
	145	150	155
Lys Gln Ile Ala Ser Val Lys Ala Ala Leu Ala Asp Ile Leu Lys Pro			
	165	170	175
Val Asn Pro Tyr Thr Gly Leu Pro Val Lys Thr Lys Glu Ala Leu Arg			
	180	185	190
Ile Phe Gly Leu Gly Trp Ala Ile Ile Leu Lys Glu Lys Gly Gly Lys			
	195	200	205
Glu Tyr Ile Met Glu His Val Asp Leu Ser Ile Asn Asp Thr Ser Val			
	210	215	220
Thr Val Ile Trp Tyr Gly Lys Lys Trp Pro Cys Leu Ala Ser Leu Ser			
	225	230	235
Thr Leu Asp Leu Cys Gly Met Thr Pro Val Phe Thr Asp Trp Tyr Lys			
	245	250	255
Thr Pro Thr Lys His Arg Leu Arg Trp His Ser Leu Ile Ala Lys Tyr			
	260	265	270
Asn Leu Ser His Leu Thr Ile Ser Thr Met Ile Gly Cys Asp Arg Leu			
	275	280	285
Ile Arg Ile Phe Cys Leu His Pro Gly Leu Leu Val Gly Val Trp Lys			
	290	295	300
Lys Glu Glu Glu Leu Ala Phe Val Met Ala Asn Leu His Phe His His			
	305	310	315
Leu Val Glu Arg Ser Thr Leu Gly Ser Ala Thr Ile Pro Tyr Glu Leu			
	325	330	335

Pro Pro His Ser Pro Phe Leu Asp Asp Ser Pro Glu Tyr Gly Leu His
340 345 350

Gly Tyr Gln Leu His Val Asp Leu His Ser Gly Gly Val Phe Tyr Leu
355 360 365

Cys Gly Thr Phe Arg Asn Leu Phe Thr Lys Arg Gly Asn Ile Glu Asn
370 375 380

Gly His Val Lys Leu Ile Val Ile His Leu Lys Asn Asn Arg Glu His
385 390 395 400

Leu Pro Leu Ile Gly Lys Val Gly Leu Ser Trp Lys Thr Asp Ile Phe
405 410 415

Asp Gly Cys Ile Lys Ser Cys Ser Met Met Asp Val Thr Leu Leu Asp
420 425 430

Glu His Gly Lys Pro Phe Trp Cys Phe Ser Ser Pro Val Cys Leu Arg
435 440 445

Ser Pro Ala Thr Pro Ser Asp Ser Ser Ser Phe Leu Gly Gln Thr Tyr
450 455 460

Asn Val Asp Tyr Val Asp Ala Glu Gly Arg Val His Val Glu Leu Val
465 470 475 480

Trp Ile Arg Glu Thr Glu Glu Tyr Leu Ile Val Asn Leu Val Leu Tyr
485 490 495

Leu Ser Ile Ala Lys Ile Asn His Trp Phe Gly Thr Glu Tyr
500 505 510

<210> 13

<211> 2184

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220>

<221> CDS

<222> (190)..(1104)

<400> 13

agaaaggctg atttggttg tgccttgctc tttctgtggg aaggctgcgg ctcacttcct 60

tccgacttct tgataatttt gcattagaca tttaactctt ctttctatga tctttccttc 120

tagacactga gttttttggt tgttgccctaa aaccttttca gaaatccctt ccctcgccat 180

cacactgac atg agt gtg ggt ctt cct ggt ccc cac agt ttg cct agt tct 231
 Met Ser Val Gly Leu Pro Gly Pro His Ser Leu Pro Ser Ser
 1 5 10

gag gaa gca tcg aat tct ggg aac gcc tca tca atg cct gca gtt ttt 279
 Glu Glu Ala Ser Asn Ser Gly Asn Ala Ser Ser Met Pro Ala Val Phe
 15 20 25 30

cat ccc gag aac tat tct tgc tta caa ggg tct gct act gag atg ctc 327
 His Pro Glu Asn Tyr Ser Cys Leu Gln Gly Ser Ala Thr Glu Met Leu
 35 40 45

tgc aca gag gct gcc tct cct cgc cct tcc tct gaa gac ctg cct ctt 375
 Cys Thr Glu Ala Ala Ser Pro Arg Pro Ser Ser Glu Asp Leu Pro Leu
 50 55 60

caa ggc agc cct gat tct tct acc agt ccc aaa caa aag ctc tca agt 423
 Gln Gly Ser Pro Asp Ser Ser Thr Ser Pro Lys Gln Lys Leu Ser Ser
 65 70 75

cct gag gct gac aag ggc cct gag gag gag gag aac aag gtc ctt gcc 471
 Pro Glu Ala Asp Lys Gly Pro Glu Glu Glu Glu Asn Lys Val Leu Ala
 80 85 90

agg aag cag aag atg cgg act gtg ttc tct cag gcc cag ctg tgt gca 519
 Arg Lys Gln Lys Met Arg Thr Val Phe Ser Gln Ala Gln Leu Cys Ala
 95 100 105 110

ctc aag gac agg ttt cag aag cag aag tac ctc agc ctc cag cag atg 567
 Leu Lys Asp Arg Phe Gln Lys Gln Lys Tyr Leu Ser Leu Gln Gln Met
 115 120 125

caa gaa ctc tcc tcc att ctg aac ctg agc tat aag cag gtt aag acc 615
 Gln Glu Leu Ser Ser Ile Leu Asn Leu Ser Tyr Lys Gln Val Lys Thr
 130 135 140

tgg ttt caa aac caa agg gtg aag tgc aag cgg tgg cag aaa aac cag 663
 Trp Phe Gln Asn Gln Arg Val Lys Cys Lys Arg Trp Gln Lys Asn Gln
 145 150 155

tgg ttg aag act agc aat ggt ctg att cag aag ggc tca gca cca gtg 711
 Trp Leu Lys Thr Ser Asn Gly Leu Ile Gln Lys Gly Ser Ala Pro Val
 160 165 170

gag tat ccc agc atc cat tgc agc tat ccc cag ggc tat ctg gtg aac 759
 Glu Tyr Pro Ser Ile His Cys Ser Tyr Pro Gln Gly Tyr Leu Val Asn
 175 180 185 190

gca tct gga agc ctt tcc atg tgg ggc agc cag act tgg acc aac cca 807

Ala Ser Gly Ser Leu Ser Met Trp Gly Ser Gln Thr Trp Thr Asn Pro
195 200 205

act tgg agc agc cag acc tgg acc aac cca act tgg aac aac cag acc 855
Thr Trp Ser Ser Gln Thr Trp Thr Asn Pro Thr Trp Asn Asn Gln Thr
210 215 220

tgg acc aac cca act tgg agc agc cag gcc tgg acc gct cag tcc tgg 903
Trp Thr Asn Pro Thr Trp Ser Ser Gln Ala Trp Thr Ala Gln Ser Trp
225 230 235

aac ggc cag cct tgg aat gct gct ccg ctc cat aac ttc ggg gag gac 951
Asn Gly Gln Pro Trp Asn Ala Ala Pro Leu His Asn Phe Gly Glu Asp
240 245 250

ttt ctg cag cct tac gta cag ttg cag caa aac ttc tct gcc agt gat 999
Phe Leu Gln Pro Tyr Val Gln Leu Gln Gln Asn Phe Ser Ala Ser Asp
255 260 265 270

ttg gag gtg aat ttg gaa gcc act agg gaa agc cat gcg cat ttt agc 1047
Leu Glu Val Asn Leu Glu Ala Thr Arg Glu Ser His Ala His Phe Ser
275 280 285

acc cca caa gcc ttg gaa tta ttc ctg aac tac tct gtg act cca cca 1095
Thr Pro Gln Ala Leu Glu Leu Phe Leu Asn Tyr Ser Val Thr Pro Pro
290 295 300

ggt gaa ata tgagacttac gcaacatctg ggcttaaagt cagggcaaag 1144
Gly Glu Ile
305

ccaggttcct tccttcttcc aaatatatttc atattttttt taaagattta tttattcatt 1204

atatgtaagt acactgtagc tgtcttcaga cactccagaa gagggcgta gatcttgta 1264

cgtatgggtg tgagccacca tgtggttgct gggatttgaa ctctgacct tcggaagagc 1324

agtcgggtgc tcttatccac tgagccatct caccagcccc tggtttattt ttttaattat 1384

tatttgcttt ttgtttatca agacagggtt tctctgcata gctctaattg tctttgaact 1444

agctctgcag accagcctgg ccttgaactc agagatctgc ccacttatct ttgcctcctg 1504

aatgctggga ccaaagggtg cataccacca cacctggcat atatattgtt tatttctatt 1564

tctattttta ttggtgccag agcaaacctt ggacttagaa catgctgggc accaactcaa 1624

cttctgagct ctatttacaa cttggtgtgt tagtgtatit gtcttagttc tgaatttgct 1684

cttttttttag tgtaaactct aggcttttga gacagtgagg tgcatatact ctctccttcc 1744

caagaataag tgcttgaaca cccttaccca cgcccaccca cccatgctag tcttttttct 1804
 tagaagcgtg ggtcttggtg tacactgtgt cattttgagg ggtgaggttt aaaagtatat 1864
 acaaagtata acgatatggt ggctactctc gaggatgaga cagaaggacc aggagtttga 1924
 gggtagctca gatatgcaat aagttcaagg ccaacctgta ctatgtttta atagtaagac 1984
 agcatctcga taaaataata aaactaaagt ctcaacaaaa taaaagcttt cacctattaa 2044
 ggtgcttgct tgccttgga gtccccaag agtaactgct atgttaatat ctgtagaaag 2104
 atgtttatat ttgactgtac catgatgaac cgatgccagc tggactagtt taaacaaaat 2164
 aaaacactaa ttttaccttt 2184

<210> 14
 <211> 305
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 14
 Met Ser Val Gly Leu Pro Gly Pro His Ser Leu Pro Ser Ser Glu Glu
 1 5 10 15
 Ala Ser Asn Ser Gly Asn Ala Ser Ser Met Pro Ala Val Phe His Pro
 20 25 30
 Glu Asn Tyr Ser Cys Leu Gln Gly Ser Ala Thr Glu Met Leu Cys Thr
 35 40 45
 Glu Ala Ala Ser Pro Arg Pro Ser Ser Glu Asp Leu Pro Leu Gln Gly
 50 55 60
 Ser Pro Asp Ser Ser Thr Ser Pro Lys Gln Lys Leu Ser Ser Pro Glu
 65 70 75 80
 Ala Asp Lys Gly Pro Glu Glu Glu Glu Asn Lys Val Leu Ala Arg Lys
 85 90 95
 Gln Lys Met Arg Thr Val Phe Ser Gln Ala Gln Leu Cys Ala Leu Lys
 100 105 110
 Asp Arg Phe Gln Lys Gln Lys Tyr Leu Ser Leu Gln Gln Met Gln Glu
 115 120 125
 Leu Ser Ser Ile Leu Asn Leu Ser Tyr Lys Gln Val Lys Thr Trp Phe
 130 135 140

Gln Asn Gln Arg Val Lys Cys Lys Arg Trp Gln Lys Asn Gln Trp Leu
145 150 155 160

Lys Thr Ser Asn Gly Leu Ile Gln Lys Gly Ser Ala Pro Val Glu Tyr
165 170 175

Pro Ser Ile His Cys Ser Tyr Pro Gln Gly Tyr Leu Val Asn Ala Ser
180 185 190

Gly Ser Leu Ser Met Trp Gly Ser Gln Thr Trp Thr Asn Pro Thr Trp
195 200 205

Ser Ser Gln Thr Trp Thr Asn Pro Thr Trp Asn Asn Gln Thr Trp Thr
210 215 220

Asn Pro Thr Trp Ser Ser Gln Ala Trp Thr Ala Gln Ser Trp Asn Gly
225 230 235 240

Gln Pro Trp Asn Ala Ala Pro Leu His Asn Phe Gly Glu Asp Phe Leu
245 250 255

Gln Pro Tyr Val Gln Leu Gln Gln Asn Phe Ser Ala Ser Asp Leu Glu
260 265 270

Val Asn Leu Glu Ala Thr Arg Glu Ser His Ala His Phe Ser Thr Pro
275 280 285

Gln Ala Leu Glu Leu Phe Leu Asn Tyr Ser Val Thr Pro Pro Gly Glu
290 295 300

Ile
305

<210> 15
<211> 2114
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (217)..(1131)

<400> 15
attataaatc tagagactcc aggatttttaa cgttctgctg gactgagctg gttgcctcat 60
gttattatgc aggcaactca ctttatccca atttcttgat acttttcctt ctggagggtcc 120

tattttctcta acatcttcca gaaaagtctt aaagctgcct taaccttttt tccagtccac 180
ctcttaaatt ttttcctcct cttcctctat actaac atg agt gtg gat cca gct 234
Met Ser Val Asp Pro Ala
1 5
tgt ccc caa agc ttg cct tgc ttt gaa gca tcc gac tgt aaa gaa tct 282
Cys Pro Gln Ser Leu Pro Cys Phe Glu Ala Ser Asp Cys Lys Glu Ser
10 15 20
tca cct atg cct gtg att tgt ggg cct gaa gaa aac tat cca tcc ttg 330
Ser Pro Met Pro Val Ile Cys Gly Pro Glu Glu Asn Tyr Pro Ser Leu
25 30 35
caa atg tct tct gct gag atg cct cac acg gag act gtc tct cct ctt 378
Gln Met Ser Ser Ala Glu Met Pro His Thr Glu Thr Val Ser Pro Leu
40 45 50
ccc tcc tcc atg gat ctg ctt att cag gac agc cct gat tct tcc acc 426
Pro Ser Ser Met Asp Leu Leu Ile Gln Asp Ser Pro Asp Ser Ser Thr
55 60 65 70
agt ccc aaa ggc aaa caa ccc act tct gca gag aat agt gtc gca aaa 474
Ser Pro Lys Gly Lys Gln Pro Thr Ser Ala Glu Asn Ser Val Ala Lys
75 80 85
aag gaa gac aag gtc cca gtc aag aaa cag aag acc aga act gtg ttc 522
Lys Glu Asp Lys Val Pro Val Lys Lys Gln Lys Thr Arg Thr Val Phe
90 95 100
tct tcc acc cag ctg tgt gta ctc aat gat aga ttt cag aga cag aaa 570
Ser Ser Thr Gln Leu Cys Val Leu Asn Asp Arg Phe Gln Arg Gln Lys
105 110 115
tac ctc agc ctc cag cag atg caa gaa ctc tcc aac atc ctg aac ctc 618
Tyr Leu Ser Leu Gln Gln Met Gln Glu Leu Ser Asn Ile Leu Asn Leu
120 125 130
agc tac aaa cag gtg aag acc tgg ttc cag aac cag aga atg aaa tct 666
Ser Tyr Lys Gln Val Lys Thr Trp Phe Gln Asn Gln Arg Met Lys Ser
135 140 145 150
aag agg tgg cag aaa aac aac tgg ccg aag aat agc aat ggt gtg acg 714
Lys Arg Trp Gln Lys Asn Asn Trp Pro Lys Asn Ser Asn Gly Val Thr
155 160 165
cag aag gcc tca gca cct acc tac ccc agc ctc tac tct tcc tac cac 762
Gln Lys Ala Ser Ala Pro Thr Tyr Pro Ser Leu Tyr Ser Ser Tyr His
170 175 180

cag gga tgc ctg gtg aac ccg act ggg aac ctt cca atg tgg agc aac 810
 Gln Gly Cys Leu Val Asn Pro Thr Gly Asn Leu Pro Met Trp Ser Asn
 185 190 195

cag acc tgg aac aat tca acc tgg agc aac cag acc cag aac atc cag 858
 Gln Thr Trp Asn Asn Ser Thr Trp Ser Asn Gln Thr Gln Asn Ile Gln
 200 205 210

tcc tgg agc aac cac tcc tgg aac act cag acc tgg tgc acc caa tcc 906
 Ser Trp Ser Asn His Ser Trp Asn Thr Gln Thr Trp Cys Thr Gln Ser
 215 220 225 230

tgg aac aat cag gcc tgg aac agt ccc ttc tat aac tgt gga gag gaa 954
 Trp Asn Asn Gln Ala Trp Asn Ser Pro Phe Tyr Asn Cys Gly Glu Glu
 235 240 245

tct ctg cag tcc tgc atg cag ttc cag cca aat tct cct gcc agt gac 1002
 Ser Leu Gln Ser Cys Met Gln Phe Gln Pro Asn Ser Pro Ala Ser Asp
 250 255 260

ttg gag gct gct ttg gaa gct gct ggg gaa ggc ctt aat gta ata cag 1050
 Leu Glu Ala Ala Leu Glu Ala Ala Gly Glu Gly Leu Asn Val Ile Gln
 265 270 275

cag acc act agg tat ttt agt act cca caa acc atg gat tta ttc cta 1098
 Gln Thr Thr Arg Tyr Phe Ser Thr Pro Gln Thr Met Asp Leu Phe Leu
 280 285 290

aac tac tcc atg aac atg caa cct gaa gac gtg tgaagatgag tgaaactgat 1151
 Asn Tyr Ser Met Asn Met Gln Pro Glu Asp Val
 295 300 305

attactcaat ttcagtctgg acactggctg aatccttcct ctccccctcct cccatccctc 1211
 ataggatttt tcttgtttgg aaaccacgtg ttctggtttc catgatgcct atccagtcaa 1271
 tctcatggag ggtggagtat ggttggagcc taatcagcga ggtttctttt ttttttttc 1331
 ctattggatc ttcttgaga aaatactttt tttttttttt ttgagacgga gtcttgctct 1391
 gtcgcccagg ctggagtgca gtggcgcggt cttggctcac tgcaagctcc gcctcccggg 1451
 ttcacgcat tctctgcct cagcctcccg agcagctggg actacaggcg cccgccacct 1511
 cgcccggcta atattttgta ttttagtag agacagggtt tcaactgtgtt agccaggatg 1571
 gtctcgatct cctgaccttg tgatccgccc gcctcggcct ccctaacagc tgggattaca 1631
 ggcgtgagcc accgcgccct gcctagaaaa gacattttta taaccttggc tgctaaggac 1691

aacattgata gaagccgtct ctggctatag ataagtagat ctaatactag tttggatatc 1751
 tttagggttt agaactaac ctcaagaata agaaatacaa gtacgaattg gtgatgaaga 1811
 tgtattcgta ttgtttggga ttgggaggct ttgcttattt ttttaaaact attgaggtaa 1871
 agggttaagc tgtaacatac ttaattgatt tcttaccgtt tttggctctg ttttgctata 1931
 tcccctaatt tgttggttgt gctaactctt gtagaaagag gtcttgtatt tgctgcatcg 1991
 taatgacatg agtactactt tagttgggtt aagttcaaat gaatgaaaca aatatttttc 2051
 ctttagttga ttttaccctg atttcaccga gtgtttcgat gagtaaatat acagcttaaa 2111
 cat 2114

<210> 16
 <211> 305
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 16
 Met Ser Val Asp Pro Ala Cys Pro Gln Ser Leu Pro Cys Phe Glu Ala
 1 5 10 15
 Ser Asp Cys Lys Glu Ser Ser Pro Met Pro Val Ile Cys Gly Pro Glu
 20 25 30
 Glu Asn Tyr Pro Ser Leu Gln Met Ser Ser Ala Glu Met Pro His Thr
 35 40 45
 Glu Thr Val Ser Pro Leu Pro Ser Ser Met Asp Leu Leu Ile Gln Asp
 50 55 60
 Ser Pro Asp Ser Ser Thr Ser Pro Lys Gly Lys Gln Pro Thr Ser Ala
 65 70 75 80
 Glu Asn Ser Val Ala Lys Lys Glu Asp Lys Val Pro Val Lys Lys Gln
 85 90 95
 Lys Thr Arg Thr Val Phe Ser Ser Thr Gln Leu Cys Val Leu Asn Asp
 100 105 110
 Arg Phe Gln Arg Gln Lys Tyr Leu Ser Leu Gln Gln Met Gln Glu Leu
 115 120 125
 Ser Asn Ile Leu Asn Leu Ser Tyr Lys Gln Val Lys Thr Trp Phe Gln
 130 135 140

Asn Gln Arg Met Lys Ser Lys Arg Trp Gln Lys Asn Asn Trp Pro Lys
145 150 155 160

Asn Ser Asn Gly Val Thr Gln Lys Ala Ser Ala Pro Thr Tyr Pro Ser
165 170 175

Leu Tyr Ser Ser Tyr His Gln Gly Cys Leu Val Asn Pro Thr Gly Asn
180 185 190

Leu Pro Met Trp Ser Asn Gln Thr Trp Asn Asn Ser Thr Trp Ser Asn
195 200 205

Gln Thr Gln Asn Ile Gln Ser Trp Ser Asn His Ser Trp Asn Thr Gln
210 215 220

Thr Trp Cys Thr Gln Ser Trp Asn Asn Gln Ala Trp Asn Ser Pro Phe
225 230 235 240

Tyr Asn Cys Gly Glu Glu Ser Leu Gln Ser Cys Met Gln Phe Gln Pro
245 250 255

Asn Ser Pro Ala Ser Asp Leu Glu Ala Ala Leu Glu Ala Ala Gly Glu
260 265 270

Gly Leu Asn Val Ile Gln Gln Thr Thr Arg Tyr Phe Ser Thr Pro Gln
275 280 285

Thr Met Asp Leu Phe Leu Asn Tyr Ser Met Asn Met Gln Pro Glu Asp
290 295 300

Val
305

<210> 17
<211> 1078
<212> DNA
<213> Mus musculus

<220>
<221> CDS
<222> (178)..(858)

<400> 17
caggggtcgg gcaggtggga gggggaagct cacatctccg ccctctgctg cctctggggg 60
tagggagcat cctaaccccc aactgtccgg tcagatccgc ctactgcccc tcatcagact 120
gctactcctg ggagcacagc acctgtcttt tacacctctt ccttgagctg ctgggga 177

atg gct ttg cct aca aag tct agc atc ttg gac ctg agc tcc ggc acc	225
Met Ala Leu Pro Thr Lys Ser Ser Ile Leu Asp Leu Ser Ser Gly Thr	
1 5 10 15	
cca tgc acc aga tct cca gag gaa agt cac gag gct tgg gca cag tgc	273
Pro Cys Thr Arg Ser Pro Glu Glu Ser His Glu Ala Trp Ala Gln Cys	
20 25 30	
aaa gat gct ggc agg cag cta ccc gag tac aag gca gtg gtg gtg ggt	321
Lys Asp Ala Gly Arg Gln Leu Pro Glu Tyr Lys Ala Val Val Val Gly	
35 40 45	
gca agt ggt gtt ggt aaa agt gct ctc acc atc cag atg act cac caa	369
Ala Ser Gly Val Gly Lys Ser Ala Leu Thr Ile Gln Met Thr His Gln	
50 55 60	
tgc ttc gtg aaa gac cat gac ccc act atc caa gat tcc tac tgg aag	417
Cys Phe Val Lys Asp His Asp Pro Thr Ile Gln Asp Ser Tyr Trp Lys	
65 70 75 80	
gaa gtg gcc agg gac aac gga ggc tac att cta aat gtt ctg gat aca	465
Glu Val Ala Arg Asp Asn Gly Gly Tyr Ile Leu Asn Val Leu Asp Thr	
85 90 95	
tct ggg cag gat att cac cgg gct ctg cgt gac cag tgc ttg gca tct	513
Ser Gly Gln Asp Ile His Arg Ala Leu Arg Asp Gln Cys Leu Ala Ser	
100 105 110	
ggt gat ggt gtg ctg ggc gtc ttt gct ctt gac gac ccc tcg tct ctg	561
Gly Asp Gly Val Leu Gly Val Phe Ala Leu Asp Asp Pro Ser Ser Leu	
115 120 125	
gac cag ttg cag cag ata tgg tcc acc tgg acc cct cac cac aag cag	609
Asp Gln Leu Gln Gln Ile Trp Ser Thr Trp Thr Pro His His Lys Gln	
130 135 140	
cct ctg gta cta gtg ggc aac aag tgt gac ctg gtg acc act gct gga	657
Pro Leu Val Leu Val Gly Asn Lys Cys Asp Leu Val Thr Thr Ala Gly	
145 150 155 160	
gat gct cat gct gcc gca gcc ctc ctt gct cac aag ttg ggg gcc ccc	705
Asp Ala His Ala Ala Ala Leu Leu Ala His Lys Leu Gly Ala Pro	
165 170 175	
ttg gtg aag acc tca gcc aag acg cgg caa ggt gtg gag gaa gcc ttt	753
Leu Val Lys Thr Ser Ala Lys Thr Arg Gln Gly Val Glu Glu Ala Phe	
180 185 190	
gcc ctg ctt gtc cat gag att cag agg gcc cag gag gct gtg gcc gaa	801

Ala Leu Leu Val His Glu Ile Gln Arg Ala Gln Glu Ala Val Ala Glu
 195 200 205

tca agc aag aag acc cga cac cag aaa gcc gtg tgt agc tgt ggc tgc 849
 Ser Ser Lys Lys Thr Arg His Gln Lys Ala Val Cys Ser Cys Gly Cys
 210 215 220

tct gta gcc tgaagatctt tgtctagcaa attgaccctt gtctcatgtc 898
 Ser Val Ala
 225

aaggtgacaa ttctcttgta ataagatctc cctctccgac caagttacca cagacatctt 958

tttattgtca tttggtgaga agttacgtgg taacatggga catccctcat tgactgtgtt 1018

ttatgaaact ctatgcaaaa ttaaataaat gttttcagga ttcaaagctt cctttatacc 1078

<210> 18
 <211> 227
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 18
 Met Ala Leu Pro Thr Lys Ser Ser Ile Leu Asp Leu Ser Ser Gly Thr
 1 5 10 15

Pro Cys Thr Arg Ser Pro Glu Glu Ser His Glu Ala Trp Ala Gln Cys
 20 25 30

Lys Asp Ala Gly Arg Gln Leu Pro Glu Tyr Lys Ala Val Val Val Gly
 35 40 45

Ala Ser Gly Val Gly Lys Ser Ala Leu Thr Ile Gln Met Thr His Gln
 50 55 60

Cys Phe Val Lys Asp His Asp Pro Thr Ile Gln Asp Ser Tyr Trp Lys
 65 70 75 80

Glu Val Ala Arg Asp Asn Gly Gly Tyr Ile Leu Asn Val Leu Asp Thr
 85 90 95

Ser Gly Gln Asp Ile His Arg Ala Leu Arg Asp Gln Cys Leu Ala Ser
 100 105 110

Gly Asp Gly Val Leu Gly Val Phe Ala Leu Asp Asp Pro Ser Ser Leu
 115 120 125

Asp Gln Leu Gln Gln Ile Trp Ser Thr Trp Thr Pro His His Lys Gln
 130 135 140

Pro Leu Val Leu Val Gly Asn Lys Cys Asp Leu Val Thr Thr Ala Gly
145 150 155 160

Asp Ala His Ala Ala Ala Ala Leu Leu Ala His Lys Leu Gly Ala Pro
165 170 175

Leu Val Lys Thr Ser Ala Lys Thr Arg Gln Gly Val Glu Glu Ala Phe
180 185 190

Ala Leu Leu Val His Glu Ile Gln Arg Ala Gln Glu Ala Val Ala Glu
195 200 205

Ser Ser Lys Lys Thr Arg His Gln Lys Ala Val Cys Ser Cys Gly Cys
210 215 220

Ser Val Ala
225

<210> 19
<211> 1266
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (252)..(950)

<400> 19
cgtgaggagg gaaggagaga tgggggggacg tgggacaggg agaaaacaac ataatcata 60
tatatatagc atgcaaattg gaaggtgatc agcacacaat aggcattcaa taaatgttga 120
aataatgaca cccactgtc tccttgccct caaatgggtct cccctaacgt atcccctgtt 180
gtcttgcttc ttctcttccc acttgacagag cctgctgccc acgtctcttc cctgagctgc 240
ctgctgggggt c atg gag ctg cca aca aag cct ggc acc ttc gac ctg ggc 290
Met Glu Leu Pro Thr Lys Pro Gly Thr Phe Asp Leu Gly
1 5 10

ctg gcc aca tgg agc cct tcc ttc cag ggg gaa acc cac cgg gct cag 338
Leu Ala Thr Trp Ser Pro Ser Phe Gln Gly Glu Thr His Arg Ala Gln
15 20 25

gca cgc cgc agg gat gtt ggc agg cag ctg cct gag tac aag gct gtg 386
Ala Arg Arg Arg Asp Val Gly Arg Gln Leu Pro Glu Tyr Lys Ala Val
30 35 40 45

gtg gtg ggc gcc agt ggc gtg ggc aag agt gcg ctg acc atc cag ctg	434
Val Val Gly Ala Ser Gly Val Gly Lys Ser Ala Leu Thr Ile Gln Leu	
50 55 60	
aac cac cag tgc ttc gtg gag gac cac gac ccc acc atc cag gat tcc	482
Asn His Gln Cys Phe Val Glu Asp His Asp Pro Thr Ile Gln Asp Ser	
65 70 75	
tac tgg aag gag ttg acc ctg gac agt ggg gac tgc att ctg aat gtg	530
Tyr Trp Lys Glu Leu Thr Leu Asp Ser Gly Asp Cys Ile Leu Asn Val	
80 85 90	
ctg gac aca gca ggg cag gcc atc cat agg gcc ctg cgt gac cag tgc	578
Leu Asp Thr Ala Gly Gln Ala Ile His Arg Ala Leu Arg Asp Gln Cys	
95 100 105	
ctg gct gtc tgt gat ggt gtg ctg ggc gtc ttc gct ctc gat gac ccc	626
Leu Ala Val Cys Asp Gly Val Leu Gly Val Phe Ala Leu Asp Asp Pro	
110 115 120 125	
tcg tct ctg atc cag ctg cag cag ata tgg gcc acc tgg ggc cct cac	674
Ser Ser Leu Ile Gln Leu Gln Gln Ile Trp Ala Thr Trp Gly Pro His	
130 135 140	
ccc gcc cag ccc ctt gtc ctc gtg ggc aac aag tgt gac ctt gtg acc	722
Pro Ala Gln Pro Leu Val Leu Val Gly Asn Lys Cys Asp Leu Val Thr	
145 150 155	
act gct gga gat gct cat gcc gct gct gca gcc ctc gca cac agc tgg	770
Thr Ala Gly Asp Ala His Ala Ala Ala Ala Leu Ala His Ser Trp	
160 165 170	
ggg gcc cac ttc gtg gag acc tcg gcc aaa aca cgg caa ggc gtg gag	818
Gly Ala His Phe Val Glu Thr Ser Ala Lys Thr Arg Gln Gly Val Glu	
175 180 185	
gag gcc ttt tcc ctg ctg gtc cat gag atc cag agg gtc cag gag gcc	866
Glu Ala Phe Ser Leu Leu Val His Glu Ile Gln Arg Val Gln Glu Ala	
190 195 200 205	
atg gcg aag gag ccc atg gca agg tcc tgt agg gag aag acc cgg cac	914
Met Ala Lys Glu Pro Met Ala Arg Ser Cys Arg Glu Lys Thr Arg His	
210 215 220	
cag aag gcc acc tgc cac tgt ggc tgc tct gtg gcc tgaaggtctt	960
Gln Lys Ala Thr Cys His Cys Gly Cys Ser Val Ala	
225 230	

ggccaagaaa tgtagacctt tccccaggcc aggggtgattg ttcatttgac atgagacccc 1020

tgaggcaact agctttgagg gacacatcag gtatactagg gaaagatgga catctctctt 1080
 gttttcactt ggtgaggggc tttttggtaa catgggagtg cctaattgtt cttttgttat 1140
 gtcaagttga aagattttgt gcaaaattaa ataaatgggtg ttttgggttt caaagctgcc 1200
 tccatgccga gtgttgtgtg ggtgggagtg agactgggta gaatgttact tgagttgtga 1260
 gaattc 1266

<210> 20

<211> 233

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 20

Met Glu Leu Pro Thr Lys Pro Gly Thr Phe Asp Leu Gly Leu Ala Thr
 1 5 10 15

Trp Ser Pro Ser Phe Gln Gly Glu Thr His Arg Ala Gln Ala Arg Arg
 20 25 30

Arg Asp Val Gly Arg Gln Leu Pro Glu Tyr Lys Ala Val Val Val Gly
 35 40 45

Ala Ser Gly Val Gly Lys Ser Ala Leu Thr Ile Gln Leu Asn His Gln
 50 55 60

Cys Phe Val Glu Asp His Asp Pro Thr Ile Gln Asp Ser Tyr Trp Lys
 65 70 75 80

Glu Leu Thr Leu Asp Ser Gly Asp Cys Ile Leu Asn Val Leu Asp Thr
 85 90 95

Ala Gly Gln Ala Ile His Arg Ala Leu Arg Asp Gln Cys Leu Ala Val
 100 105 110

Cys Asp Gly Val Leu Gly Val Phe Ala Leu Asp Asp Pro Ser Ser Leu
 115 120 125

Ile Gln Leu Gln Gln Ile Trp Ala Thr Trp Gly Pro His Pro Ala Gln
 130 135 140

Pro Leu Val Leu Val Gly Asn Lys Cys Asp Leu Val Thr Thr Ala Gly
 145 150 155 160

Asp Ala His Ala Ala Ala Ala Leu Ala His Ser Trp Gly Ala His
 165 170 175

Phe Val Glu Thr Ser Ala Lys Thr Arg Gln Gly Val Glu Glu Ala Phe
 180 185 190

Ser Leu Leu Val His Glu Ile Gln Arg Val Gln Glu Ala Met Ala Lys
 195 200 205

Glu Pro Met Ala Arg Ser Cys Arg Glu Lys Thr Arg His Gln Lys Ala
 210 215 220

Thr Cys His Cys Gly Cys Ser Val Ala
 225 230

<210> 21
 <211> 1063
 <212> DNA
 <213> Mus musculus

<220>
 <221> CDS
 <222> (177)..(872)

<400> 21
 gatacaaatt cgaatgtagg tgctaggcgc gcttgtgtta gagggtttgt taggggagac 60
 tgatggaatc cacagtccaa tgagtacagg gcctgtcctc cgtgtggcag cttcaccg 120
 gaggttgctgg cctggctgcc tacctgcttt cctgagatcc agggactttt cccaga atg 179
 Met
 1

gct ttg ggt gac ctc ctg ctg tct gtc ctc tct gcc cag gaa atg aat 227
 Ala Leu Gly Asp Leu Leu Leu Ser Val Leu Ser Ala Gln Glu Met Asn
 5 10 15

gcc ctt cgt ggc cag gtg ggc ggg gac gtc aat gtg gag atg gac gcc 275
 Ala Leu Arg Gly Gln Val Gly Gly Asp Val Asn Val Glu Met Asp Ala
 20 25 30

gcc ccc ggt gtg gac ctg agc cgc atc ctg aac gag atg cgg gat cag 323
 Ala Pro Gly Val Asp Leu Ser Arg Ile Leu Asn Glu Met Arg Asp Gln
 35 40 45

tat gag aag atg gcg gag aag aac cgc aag gat gct gag gaa tgg ttc 371
 Tyr Glu Lys Met Ala Glu Lys Asn Arg Lys Asp Ala Glu Glu Trp Phe
 50 55 60 65

ttc acc aag aca gag gag ctg aac cga gaa gtg gcc acc aac acg gag 419

Phe Thr Lys Thr Glu Glu Leu Asn Arg Glu Val Ala Thr Asn Thr Glu
 70 75 80

gcc ctg cag agc agc cgg aca gag atc acg gag ctc cgc cgc tct gtg 467
 Ala Leu Gln Ser Ser Arg Thr Glu Ile Thr Glu Leu Arg Arg Ser Val
 85 90 95

cag aac ctg gag att gag ctg cag tcc cag ctc agc atg aaa gca tca 515
 Gln Asn Leu Glu Ile Glu Leu Gln Ser Gln Leu Ser Met Lys Ala Ser
 100 105 110

ctg gag aac agc ctg gca gag aca gag gcg cgc tat ggg gcc cag ctg 563
 Leu Glu Asn Ser Leu Ala Glu Thr Glu Ala Arg Tyr Gly Ala Gln Leu
 115 120 125

gcg cag ctg cag ggc ctc att agc agt gtg gaa cag cag ctg tgt gag 611
 Ala Gln Leu Gln Gly Leu Ile Ser Ser Val Glu Gln Gln Leu Cys Glu
 130 135 140 145

ctg cgt tgt gac atg gaa agg cag aat cat gag tac cag gtg ctg ctg 659
 Leu Arg Cys Asp Met Glu Arg Gln Asn His Glu Tyr Gln Val Leu Leu
 150 155 160

gat gtg aag acc cga ctg gag cag gag atc gcc acc tac cgc cgt ctg 707
 Asp Val Lys Thr Arg Leu Glu Gln Glu Ile Ala Thr Tyr Arg Arg Leu
 165 170 175

ctg gag ggc gag gac gcc cac ctg gct act caa tac tcc tca tcc ctg 755
 Leu Glu Gly Glu Asp Ala His Leu Ala Thr Gln Tyr Ser Ser Ser Leu
 180 185 190

gct tcg cag ccc tcc cga gaa ggc atg gtg acc agc cgc cag gtg cgc 803
 Ala Ser Gln Pro Ser Arg Glu Gly Met Val Thr Ser Arg Gln Val Arg
 195 200 205

acc att gtg gag gaa gtc cag gat ggt aag gtg ttt tcc tcc aga gag 851
 Thr Ile Val Glu Glu Val Gln Asp Gly Lys Val Phe Ser Ser Arg Glu
 210 215 220 225

cag gag cac cgc tcc acc cac tgaggcccct gtctgcgtat gatagcccag 902
 Gln Glu His Arg Ser Thr His
 230

gccaggacc ttaggctgca gtcacctgca tctactgccca agcctgaact cctatgagct 962

agctgttgcc ttctgtgttt gctttgtgct gcccttaca gagaggcccc ttgggttgac 1022

cccagaaatt gctaataaag ctttgaagaa gtctgaccc t 1063

<210> 22
 <211> 232
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 22

Met Ala Leu Gly Asp Leu Leu Leu Ser Val Leu Ser Ala Gln Glu Met
 1 5 10 15

Asn Ala Leu Arg Gly Gln Val Gly Gly Asp Val Asn Val Glu Met Asp
 20 25 30

Ala Ala Pro Gly Val Asp Leu Ser Arg Ile Leu Asn Glu Met Arg Asp
 35 40 45

Gln Tyr Glu Lys Met Ala Glu Lys Asn Arg Lys Asp Ala Glu Glu Trp
 50 55 60

Phe Phe Thr Lys Thr Glu Glu Leu Asn Arg Glu Val Ala Thr Asn Thr
 65 70 75 80

Glu Ala Leu Gln Ser Ser Arg Thr Glu Ile Thr Glu Leu Arg Arg Ser
 85 90 95

Val Gln Asn Leu Glu Ile Glu Leu Gln Ser Gln Leu Ser Met Lys Ala
 100 105 110

Ser Leu Glu Asn Ser Leu Ala Glu Thr Glu Ala Arg Tyr Gly Ala Gln
 115 120 125

Leu Ala Gln Leu Gln Gly Leu Ile Ser Ser Val Glu Gln Gln Leu Cys
 130 135 140

Glu Leu Arg Cys Asp Met Glu Arg Gln Asn His Glu Tyr Gln Val Leu
 145 150 155 160

Leu Asp Val Lys Thr Arg Leu Glu Gln Glu Ile Ala Thr Tyr Arg Arg
 165 170 175

Leu Leu Glu Gly Glu Asp Ala His Leu Ala Thr Gln Tyr Ser Ser Ser
 180 185 190

Leu Ala Ser Gln Pro Ser Arg Glu Gly Met Val Thr Ser Arg Gln Val
 195 200 205

Arg Thr Ile Val Glu Glu Val Gln Asp Gly Lys Val Phe Ser Ser Arg
 210 215 220

Glu Gln Glu His Arg Ser Thr His
 225 230

出証特 2 0 0 5 - 3 0 2 6 8 8 6

Asp	Gly	His	Gln	Ser	Tyr	Cys	Thr	Ile	Cys	Cys	Ser	Gly	Gly	Thr	Leu		
125						130					135						
ttc	atc	tgt	gag	agc	ccc	gac	tgt	acc	aga	tgc	tac	tgt	ttc	gag	tgt	603	
Phe	Ile	Cys	Glu	Ser	Pro	Asp	Cys	Thr	Arg	Cys	Tyr	Cys	Phe	Glu	Cys		
140					145					150					155		
gtg	gac	atc	ctg	gtg	ggc	ccc	ggg	acc	tca	gag	agg	atc	aat	gcc	atg	651	
Val	Asp	Ile	Leu	Val	Gly	Pro	Gly	Thr	Ser	Glu	Arg	Ile	Asn	Ala	Met		
				160					165					170			
gcc	tgc	tgg	gtt	tgc	ttc	ctg	tgc	ctg	ccc	ttc	tca	cgg	agt	gga	ctg	699	
Ala	Cys	Trp	Val	Cys	Phe	Leu	Cys	Leu	Pro	Phe	Ser	Arg	Ser	Gly	Leu		
			175					180					185				
ctg	cag	agg	cgc	aag	agg	tgg	cgg	cac	cag	ctg	aag	gcc	ttc	cat	gat	747	
Leu	Gln	Arg	Arg	Lys	Arg	Trp	Arg	His	Gln	Leu	Lys	Ala	Phe	His	Asp		
		190					195					200					
caa	gag	gga	gcg	ggc	cct	atg	gag	ata	tac	aag	aca	gtg	tct	gca	tgg	795	
Gln	Glu	Gly	Ala	Gly	Pro	Met	Glu	Ile	Tyr	Lys	Thr	Val	Ser	Ala	Trp		
	205					210					215						
aag	aga	cag	cca	gtg	cgg	gta	ctg	agc	ctt	ttt	aga	aat	att	gat	aaa	843	
Lys	Arg	Gln	Pro	Val	Arg	Val	Leu	Ser	Leu	Phe	Arg	Asn	Ile	Asp	Lys		
220					225					230					235		
gta	cta	aag	agt	ttg	ggc	ttt	ttg	gaa	agc	ggg	tct	ggg	tct	ggg	gga	891	
Val	Leu	Lys	Ser	Leu	Gly	Phe	Leu	Glu	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Gly		
				240				245						250			
gga	acg	ctg	aag	tac	gtg	gaa	gat	gtc	aca	aat	gtc	gtg	agg	aga	gac	939	
Gly	Thr	Leu	Lys	Tyr	Val	Glu	Asp	Val	Thr	Asn	Val	Val	Arg	Arg	Asp		
			255					260					265				
gtg	gag	aaa	tgg	ggc	ccc	ttt	gac	ctg	gtg	tac	ggc	tcg	acg	cag	ccc	987	
Val	Glu	Lys	Trp	Gly	Pro	Phe	Asp	Leu	Val	Tyr	Gly	Ser	Thr	Gln	Pro		
		270				275						280					
cta	ggc	agc	tct	tgt	gat	cgc	tgt	ccc	ggc	tgg	tac	atg	ttc	cag	ttc	1035	
Leu	Gly	Ser	Ser	Cys	Asp	Arg	Cys	Pro	Gly	Trp	Tyr	Met	Phe	Gln	Phe		
	285					290					295						
cac	cgg	atc	ctg	cag	tat	gcg	ctg	cct	cgc	cag	gag	agt	cag	cgg	ccc	1083	
His	Arg	Ile	Leu	Gln	Tyr	Ala	Leu	Pro	Arg	Gln	Glu	Ser	Gln	Arg	Pro		
300					305					310					315		
ttc	ttc	tgg	ata	ttc	atg	gac	aat	ctg	ctg	ctg	act	gag	gat	gac	caa	1131	
Phe	Phe	Trp	Ile	Phe	Met	Asp	Asn	Leu	Leu	Leu	Thr	Glu	Asp	Asp	Gln		
				320					325					330			

gag aca act acc cgc ttc ctt cag aca gag gct gtg acc ctc cag gat 1179
 Glu Thr Thr Thr Arg Phe Leu Gln Thr Glu Ala Val Thr Leu Gln Asp
 335 340 345

 gtc cgt ggc aga gac tac cag aat gct atg cgg gtg tgg agc aac att 1227
 Val Arg Gly Arg Asp Tyr Gln Asn Ala Met Arg Val Trp Ser Asn Ile
 350 355 360

 cca ggg ctg aag agc aag cat gcg ccc ctg acc cca aag gaa gaa gag 1275
 Pro Gly Leu Lys Ser Lys His Ala Pro Leu Thr Pro Lys Glu Glu Glu
 365 370 375

 tat ctg caa gcc caa gtc aga agc agg agc aag ctg gac gcc ccg aaa 1323
 Tyr Leu Gln Ala Gln Val Arg Ser Arg Ser Lys Leu Asp Ala Pro Lys
 380 385 390 395

 gtt gac ctc ctg gtg aag aac tgc ctt ctc ccg ctg aga gag tac ttc 1371
 Val Asp Leu Leu Val Lys Asn Cys Leu Leu Pro Leu Arg Glu Tyr Phe
 400 405 410

 aag tat ttt tct caa aac tca ctt cct ctt tagaaatgaa tcaccataag 1421
 Lys Tyr Phe Ser Gln Asn Ser Leu Pro Leu
 415 420

 atgaaagtct ttcctagaac cagggcagat ttcttctctaa ggtctcttcc ctccacagtt 1481
 ttctctgggtt tgctttcagg ccttcggggtt tctctctgt ttgattgccca ggatgcctct 1541
 gtgcagctca ctttgcgggg tgggaggtgc ctacggctct gcacaagttc ccggtgggat 1601
 aacctgccat gtttctctga aactgtgtgt acctgttgtg aagtttttca aatatatcat 1661
 aggattgtt 1670

<210> 24
 <211> 421
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 24
 Met Gly Ser Arg Glu Thr Pro Ser Ser Cys Ser Lys Thr Leu Glu Thr
 1 5 10 15

 Leu Asp Leu Glu Thr Ser Asp Ser Ser Ser Pro Asp Ala Asp Ser Pro
 20 25 30

 Leu Glu Glu Gln Trp Leu Lys Ser Ser Pro Ala Leu Lys Glu Asp Ser
 35 40 45

Val Asp Val Val Leu Glu Asp Cys Lys Glu Pro Leu Ser Pro Ser Ser
50 55 60

Pro Pro Thr Gly Arg Glu Met Ile Arg Tyr Glu Val Lys Val Asn Arg
65 70 75 80

Arg Ser Ile Glu Asp Ile Cys Leu Cys Cys Gly Thr Leu Gln Val Tyr
85 90 95

Thr Arg His Pro Leu Phe Glu Gly Gly Leu Cys Ala Pro Cys Lys Asp
100 105 110

Lys Phe Leu Glu Ser Leu Phe Leu Tyr Asp Asp Asp Gly His Gln Ser
115 120 125

Tyr Cys Thr Ile Cys Cys Ser Gly Gly Thr Leu Phe Ile Cys Glu Ser
130 135 140

Pro Asp Cys Thr Arg Cys Tyr Cys Phe Glu Cys Val Asp Ile Leu Val
145 150 155 160

Gly Pro Gly Thr Ser Glu Arg Ile Asn Ala Met Ala Cys Trp Val Cys
165 170 175

Phe Leu Cys Leu Pro Phe Ser Arg Ser Gly Leu Leu Gln Arg Arg Lys
180 185 190

Arg Trp Arg His Gln Leu Lys Ala Phe His Asp Gln Glu Gly Ala Gly
195 200 205

Pro Met Glu Ile Tyr Lys Thr Val Ser Ala Trp Lys Arg Gln Pro Val
210 215 220

Arg Val Leu Ser Leu Phe Arg Asn Ile Asp Lys Val Leu Lys Ser Leu
225 230 235 240

Gly Phe Leu Glu Ser Gly Ser Gly Ser Gly Gly Gly Thr Leu Lys Tyr
245 250 255

Val Glu Asp Val Thr Asn Val Val Arg Arg Asp Val Glu Lys Trp Gly
260 265 270

Pro Phe Asp Leu Val Tyr Gly Ser Thr Gln Pro Leu Gly Ser Ser Cys
275 280 285

Asp Arg Cys Pro Gly Trp Tyr Met Phe Gln Phe His Arg Ile Leu Gln
290 295 300

Tyr Ala Leu Pro Arg Gln Glu Ser Gln Arg Pro Phe Phe Trp Ile Phe

```
<400> 25
cccatctcca cccctcccct gaaccccact cccactgag gtccccaac cccacccctc 60
actccaccct gagggcccca tcctctgaac cccaatcccc cagccccact gagctcttaa 120
ccctccccac ctgagggttc cctttccctg cccgtcccc agcttcctag ctccccaccc 180
caagtgaccc cccgcagctc ctgcgccctc ccactgcaaa ccggcactga agggctgccc 240
cgcccccgcc cctccccgcc cccgcgggac acgcccagat tctttgcccc catagcctgg 300
tgacctctgg ccaccgcgtg tcccaggtgg gcctggatcc ttccagctca ttctttgcct 360
gcgccgtccc tcgttccatg gccagtcct ccccggggac cctgagcctg gaagccccgg 420
accactggaa ccttgaaccc accagctggc tgtacccgga gccgtggcag cagccctcat 480
```

cccc atg gcg gcc atc cca gcc ctg gac cca gag gcc gag ccc agc atg 529
Met Ala Ala Ile Pro Ala Leu Asp Pro Glu Ala Glu Pro Ser Met
1 5 10 15

gac gtg att ttg gtg gga tcc agt gag ctc tca agc tcc gtt tca ccc 577
Asp Val Ile Leu Val Gly Ser Ser Glu Leu Ser Ser Ser Val Ser Pro
20 25 30

ggg aca ggc aga gat ctt att gca tat gaa gtc aag gct aac cag cga 625
Gly Thr Gly Arg Asp Leu Ile Ala Tyr Glu Val Lys Ala Asn Gln Arg
35 40 45

aat ata gaa gac atc tgc atc tgc tgc gga agt ctc cag gtt cac aca 673
Asn Ile Glu Asp Ile Cys Ile Cys Cys Gly Ser Leu Gln Val His Thr
50 55 60

cag cac cct ctg ttt gag gga ggg atc tgc gcc cca tgt aag gac aag 721
Gln His Pro Leu Phe Glu Gly Gly Ile Cys Ala Pro Cys Lys Asp Lys
65 70 75

ttc ctg gat gcc ctc ttc ctg tac gac gat gac ggg tac caa tcc tac 769
Phe Leu Asp Ala Leu Phe Leu Tyr Asp Asp Gly Tyr Gln Ser Tyr
80 85 90 95

tgc tcc atc tgc tgc tcc gga gag acg ctg ctc atc tgc gga aac cct 817
Cys Ser Ile Cys Cys Ser Gly Glu Thr Leu Leu Ile Cys Gly Asn Pro
100 105 110

gat tgc acc cga tgc tac tgc ttc gag tgt gtg gat agc ctg gtc ggc 865
Asp Cys Thr Arg Cys Tyr Cys Phe Glu Cys Val Asp Ser Leu Val Gly
115 120 125

ccc ggg acc tcg ggg aag gtg cac gcc atg agc aac tgg gtg tgc tac 913
Pro Gly Thr Ser Gly Lys Val His Ala Met Ser Asn Trp Val Cys Tyr
130 135 140

ctg tgc ctg ccg tcc tcc cga agc ggg ctg ctg cag cgt cgg agg aag 961
Leu Cys Leu Pro Ser Ser Arg Ser Gly Leu Leu Gln Arg Arg Arg Lys
145 150 155

tgg cgc agc cag ctc aag gcc ttc tac gac cga gag tcg gag aat ccc 1009
Trp Arg Ser Gln Leu Lys Ala Phe Tyr Asp Arg Glu Ser Glu Asn Pro
160 165 170 175

ctt gag atg ttc gaa acc gtg cct gtg tgg agg aga cag cca gtc cgg 1057
Leu Glu Met Phe Glu Thr Val Pro Val Trp Arg Arg Gln Pro Val Arg
180 185 190

gtg ctg tcc ctt ttt gaa gac atc aag aaa gag ctg acg agt ttg ggc 1105

Val	Leu	Ser	Leu	Phe	Glu	Asp	Ile	Lys	Lys	Glu	Leu	Thr	Ser	Leu	Gly	
			195					200					205			
ttt	ttg	gaa	agt	ggt	tct	gac	ccg	gga	caa	ctg	aag	cat	gtg	gtt	gat	1153
Phe	Leu	Glu	Ser	Gly	Ser	Asp	Pro	Gly	Gln	Leu	Lys	His	Val	Val	Asp	
		210					215					220				
gtc	aca	gac	aca	gtg	agg	aag	gat	gtg	gag	gag	tgg	gga	ccc	ttc	gat	1201
Val	Thr	Asp	Thr	Val	Arg	Lys	Asp	Val	Glu	Glu	Trp	Gly	Pro	Phe	Asp	
	225					230					235					
ctt	gtg	tac	ggc	gcc	aca	gct	ccc	ctg	ggc	cac	acc	tgt	gac	cgt	cct	1249
Leu	Val	Tyr	Gly	Ala	Thr	Ala	Pro	Leu	Gly	His	Thr	Cys	Asp	Arg	Pro	
240					245					250					255	
ccc	agc	tgg	tac	ctg	ttc	cag	ttc	cac	cgg	ttc	ctg	cag	tac	gca	cgg	1297
Pro	Ser	Trp	Tyr	Leu	Phe	Gln	Phe	His	Arg	Phe	Leu	Gln	Tyr	Ala	Arg	
				260					265					270		
ccc	aag	cca	ggc	agc	ccc	agg	ccc	ttc	ttc	tgg	atg	ttc	gtg	gac	aat	1345
Pro	Lys	Pro	Gly	Ser	Pro	Arg	Pro	Phe	Phe	Trp	Met	Phe	Val	Asp	Asn	
		275						280					285			
ctg	gtg	ctg	aac	aag	gaa	gac	ctg	gac	gtc	gca	tct	cgc	ttc	ctg	gag	1393
Leu	Val	Leu	Asn	Lys	Glu	Asp	Leu	Asp	Val	Ala	Ser	Arg	Phe	Leu	Glu	
		290					295					300				
atg	gag	cca	gtc	acc	atc	cca	gat	gtc	cac	ggc	gga	tcc	ttg	cag	aat	1441
Met	Glu	Pro	Val	Thr	Ile	Pro	Asp	Val	His	Gly	Gly	Ser	Leu	Gln	Asn	
	305					310					315					
gct	gtc	cgc	gtg	tgg	agc	aac	atc	cca	gcc	ata	agg	agc	agc	agg	cac	1489
Ala	Val	Arg	Val	Trp	Ser	Asn	Ile	Pro	Ala	Ile	Arg	Ser	Ser	Arg	His	
320					325					330					335	
tgg	gct	ctg	gtt	tcg	gaa	gaa	gaa	ttg	tcc	ctg	ctg	gcc	cag	aac	aag	1537
Trp	Ala	Leu	Val	Ser	Glu	Glu	Glu	Leu	Ser	Leu	Leu	Ala	Gln	Asn	Lys	
				340					345					350		
cag	agc	tcg	aag	ctc	gcg	gcc	aag	tgg	ccc	acc	aag	ctg	gtg	aag	aac	1585
Gln	Ser	Ser	Lys	Leu	Ala	Ala	Lys	Trp	Pro	Thr	Lys	Leu	Val	Lys	Asn	
			355					360					365			
tgc	ttt	ctc	ccc	cta	aga	gaa	tat	ttc	aag	tat	ttt	tca	aca	gaa	ctc	1633
Cys	Phe	Leu	Pro	Leu	Arg	Glu	Tyr	Phe	Lys	Tyr	Phe	Ser	Thr	Glu	Leu	
		370					375					380				
act	tcc	tct	tta	taa	tga	gtc	act	tact	gtg	ga	gaaaa	aag	act	tttc	ccta	1685
Thr	Ser	Ser	Leu													
			385													

gaacaaaggc aactttcctc

1705

<210> 26
 <211> 387
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 26
 Met Ala Ala Ile Pro Ala Leu Asp Pro Glu Ala Glu Pro Ser Met Asp
 1 5 10 15
 Val Ile Leu Val Gly Ser Ser Glu Leu Ser Ser Ser Val Ser Pro Gly
 20 25 30
 Thr Gly Arg Asp Leu Ile Ala Tyr Glu Val Lys Ala Asn Gln Arg Asn
 35 40 45
 Ile Glu Asp Ile Cys Ile Cys Cys Gly Ser Leu Gln Val His Thr Gln
 50 55 60
 His Pro Leu Phe Glu Gly Gly Ile Cys Ala Pro Cys Lys Asp Lys Phe
 65 70 75 80
 Leu Asp Ala Leu Phe Leu Tyr Asp Asp Asp Gly Tyr Gln Ser Tyr Cys
 85 90 95
 Ser Ile Cys Cys Ser Gly Glu Thr Leu Leu Ile Cys Gly Asn Pro Asp
 100 105 110
 Cys Thr Arg Cys Tyr Cys Phe Glu Cys Val Asp Ser Leu Val Gly Pro
 115 120 125
 Gly Thr Ser Gly Lys Val His Ala Met Ser Asn Trp Val Cys Tyr Leu
 130 135 140
 Cys Leu Pro Ser Ser Arg Ser Gly Leu Leu Gln Arg Arg Arg Lys Trp
 145 150 155 160
 Arg Ser Gln Leu Lys Ala Phe Tyr Asp Arg Glu Ser Glu Asn Pro Leu
 165 170 175
 Glu Met Phe Glu Thr Val Pro Val Trp Arg Arg Gln Pro Val Arg Val
 180 185 190
 Leu Ser Leu Phe Glu Asp Ile Lys Lys Glu Leu Thr Ser Leu Gly Phe
 195 200 205
 Leu Glu Ser Gly Ser Asp Pro Gly Gln Leu Lys His Val Val Asp Val

210 215 220
 Thr Asp Thr Val Arg Lys Asp Val Glu Glu Trp Gly Pro Phe Asp Leu
 225 230 235 240
 Val Tyr Gly Ala Thr Ala Pro Leu Gly His Thr Cys Asp Arg Pro Pro
 245 250 255
 Ser Trp Tyr Leu Phe Gln Phe His Arg Phe Leu Gln Tyr Ala Arg Pro
 260 265 270
 Lys Pro Gly Ser Pro Arg Pro Phe Phe Trp Met Phe Val Asp Asn Leu
 275 280 285
 Val Leu Asn Lys Glu Asp Leu Asp Val Ala Ser Arg Phe Leu Glu Met
 290 295 300
 Glu Pro Val Thr Ile Pro Asp Val His Gly Gly Ser Leu Gln Asn Ala
 305 310 315 320
 Val Arg Val Trp Ser Asn Ile Pro Ala Ile Arg Ser Ser Arg His Trp
 325 330 335
 Ala Leu Val Ser Glu Glu Glu Leu Ser Leu Leu Ala Gln Asn Lys Gln
 340 345 350
 Ser Ser Lys Leu Ala Ala Lys Trp Pro Thr Lys Leu Val Lys Asn Cys
 355 360 365
 Phe Leu Pro Leu Arg Glu Tyr Phe Lys Tyr Phe Ser Thr Glu Leu Thr
 370 375 380
 Ser Ser Leu
 385

<210> 27
 <211> 1560
 <212> DNA
 <213> Mus musculus

<220>
 <221> CDS
 <222> (147)..(1367)

<400> 27
 ggtgcatgct aggggcttac gaaggctggt ggtgcagagg ctcccaggcc aggtcttttt 60

gtcggtggtg agggacgctc actctcactc cgcgtgctgt ctccccgtct gtgtgctgtg 120

atctcctctg tgagagaagg gccagg atg ttc gag gtc ctg gtg ctg aag att 173
Met Phe Glu Val Leu Val Leu Lys Ile
1 5

gaa gat cca ggt tgc ttc tgg gta att ata aaa gga tgt agt cat ttt 221
Glu Asp Pro Gly Cys Phe Trp Val Ile Ile Lys Gly Cys Ser His Phe
10 15 20 25

tta gaa caa gaa gtt gac tac caa aaa cta aac act gcc atg aat gac 269
Leu Glu Gln Glu Val Asp Tyr Gln Lys Leu Asn Thr Ala Met Asn Asp
30 35 40

ttc tat aac agc atg tgt cag gac gta gaa atg aaa cca tta atg ctg 317
Phe Tyr Asn Ser Met Cys Gln Asp Val Glu Met Lys Pro Leu Met Leu
45 50 55

gaa gaa ggg cag gtg tgt gtg gtg tac tgc cag gag ctg aag tgc tgg 365
Glu Glu Gly Gln Val Cys Val Val Tyr Cys Gln Glu Leu Lys Cys Trp
60 65 70

tgc agg gct ctg att aag tcc atc atc tct tct gca gac cat tac ctg 413
Cys Arg Ala Leu Ile Lys Ser Ile Ile Ser Ser Ala Asp His Tyr Leu
75 80 85

gca gag tgt ttc ctg gtc gat ttt gcc aag tat att cca gta aaa tct 461
Ala Glu Cys Phe Leu Val Asp Phe Ala Lys Tyr Ile Pro Val Lys Ser
90 95 100 105

aaa aac atc cga gtt gca gta gag tct ttt atg cag ctt cct tac aga 509
Lys Asn Ile Arg Val Ala Val Glu Ser Phe Met Gln Leu Pro Tyr Arg
110 115 120

gca aaa aaa ttc aga ctt tac ggt aca aag cct gtg aca ttg cac att 557
Ala Lys Lys Phe Arg Leu Tyr Gly Thr Lys Pro Val Thr Leu His Ile
125 130 135

gac ttc tgt gaa gac aat gct gag att gta cct gcc aca aaa tgg gac 605
Asp Phe Cys Glu Asp Asn Ala Glu Ile Val Pro Ala Thr Lys Trp Asp
140 145 150

agt gca gcc atc cag tac ttt cag aac ctt cta aga gca act acc caa 653
Ser Ala Ala Ile Gln Tyr Phe Gln Asn Leu Leu Arg Ala Thr Thr Gln
155 160 165

gtg gaa gca aaa cta tgt gcg gtg gaa gaa gat act ttt gag gtt tac 701
Val Glu Ala Lys Leu Cys Ala Val Glu Glu Asp Thr Phe Glu Val Tyr
170 175 180 185

ctt tat gca aca ata aaa aat gaa aaa gtt tgt gtt aat gat gac cta 749

Leu Tyr Ala Thr	Ile Lys Asn Glu Lys Val Cys Val Asn Asp Asp Leu	
190	195	200
ggt gca aag aat ttt gct tat tat gtg tca cca atg ggg aat aaa aac	797	
Val Ala Lys Asn Phe Ala Tyr Tyr Val Ser Pro Met Gly Asn Lys Asn		
205	210	215
ctc aat cct ttg gag aaa ccc agg cag agt ctc aat tcg gtg acc tgc	845	
Leu Asn Pro Leu Glu Lys Pro Arg Gln Ser Leu Asn Ser Val Thr Cys		
220	225	230
tcc agt aag ctc agc cca tca ctt act ctg tgg cca atg ctt cta caa	893	
Ser Ser Lys Leu Ser Pro Ser Leu Thr Leu Trp Pro Met Leu Leu Gln		
235	240	245
gga aaa gac tat cac aga atg gaa aat aaa gct cta aac tat aag gat	941	
Gly Lys Asp Tyr His Arg Met Glu Asn Lys Ala Leu Asn Tyr Lys Asp		
250	255	260
tcc ttg aca gac tcg cct aaa atg atg ctt gag aag cag cag cag agc	989	
Ser Leu Thr Asp Ser Pro Lys Met Met Leu Glu Lys Gln Gln Gln Ser		
270	275	280
ctc cct tta aag cac acg gag aag tgt act gaa tct tct gtg tac tgg	1037	
Leu Pro Leu Lys His Thr Glu Lys Cys Thr Glu Ser Ser Val Tyr Trp		
285	290	295
cca acc aaa aga ggc ata acc ata tat gct gat cca gat gtt cca tca	1085	
Pro Thr Lys Arg Gly Ile Thr Ile Tyr Ala Asp Pro Asp Val Pro Ser		
300	305	310
gta agt ggg tct agc cag agg ccg aat gag aag cca ctg cgg ttg act	1133	
Val Ser Gly Ser Ser Gln Arg Pro Asn Glu Lys Pro Leu Arg Leu Thr		
315	320	325
gaa aag aaa gac tgt gac gag aag aac ggc tgt gta aaa tta ctg cag	1181	
Glu Lys Lys Asp Cys Asp Glu Lys Asn Gly Cys Val Lys Leu Leu Gln		
330	335	340
ttt cta aat cct gat cct ttg aga gct gat ggg acc tca gac ctg cac	1229	
Phe Leu Asn Pro Asp Pro Leu Arg Ala Asp Gly Thr Ser Asp Leu His		
350	355	360
cag ttg cag aag gtg aag ctg ggc aca ctg cag cct ggg gtg gtg ctc	1277	
Gln Leu Gln Lys Val Lys Leu Gly Thr Leu Gln Pro Gly Val Val Leu		
365	370	375
cgg aac agg atc gag ccc tgc cta acc ctg gag aaa tca cct ctg tcg	1325	
Arg Asn Arg Ile Glu Pro Cys Leu Thr Leu Glu Lys Ser Pro Leu Ser		
380	385	390

gca gac ctg aag aag gtg aac atg ttc tta aag cca gac tcc 1367
 Ala Asp Leu Lys Lys Val Asn Met Phe Leu Lys Pro Asp Ser
 395 400 405

tgacgacatg ccagcccttt ccaacacaga gtgttgcttt gttttgcttt gtctgttctg 1427
 ttctaagagt gacggggatg aaatacaggg ctttgcgctt cctgggcatg cattcatcac 1487
 tgaaccatac cccaattcca taggaggatt ttaaataaac acttctaagg ctacattgca 1547
 gaattcttgc tcc 1560

<210> 28
 <211> 407
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 28
 Met Phe Glu Val Leu Val Leu Lys Ile Glu Asp Pro Gly Cys Phe Trp
 1 5 10 15

Val Ile Ile Lys Gly Cys Ser His Phe Leu Glu Gln Glu Val Asp Tyr
 20 25 30

Gln Lys Leu Asn Thr Ala Met Asn Asp Phe Tyr Asn Ser Met Cys Gln
 35 40 45

Asp Val Glu Met Lys Pro Leu Met Leu Glu Glu Gly Gln Val Cys Val
 50 55 60

Val Tyr Cys Gln Glu Leu Lys Cys Trp Cys Arg Ala Leu Ile Lys Ser
 65 70 75 80

Ile Ile Ser Ser Ala Asp His Tyr Leu Ala Glu Cys Phe Leu Val Asp
 85 90 95

Phe Ala Lys Tyr Ile Pro Val Lys Ser Lys Asn Ile Arg Val Ala Val
 100 105 110

Glu Ser Phe Met Gln Leu Pro Tyr Arg Ala Lys Lys Phe Arg Leu Tyr
 115 120 125

Gly Thr Lys Pro Val Thr Leu His Ile Asp Phe Cys Glu Asp Asn Ala
 130 135 140

Glu Ile Val Pro Ala Thr Lys Trp Asp Ser Ala Ala Ile Gln Tyr Phe
 145 150 155 160

Gln Asn Leu Leu Arg Ala Thr Thr Gln Val Glu Ala Lys Leu Cys Ala
 165 170 175
 Val Glu Glu Asp Thr Phe Glu Val Tyr Leu Tyr Ala Thr Ile Lys Asn
 180 185 190
 Glu Lys Val Cys Val Asn Asp Asp Leu Val Ala Lys Asn Phe Ala Tyr
 195 200 205
 Tyr Val Ser Pro Met Gly Asn Lys Asn Leu Asn Pro Leu Glu Lys Pro
 210 215 220
 Arg Gln Ser Leu Asn Ser Val Thr Cys Ser Ser Lys Leu Ser Pro Ser
 225 230 235 240
 Leu Thr Leu Trp Pro Met Leu Leu Gln Gly Lys Asp Tyr His Arg Met
 245 250 255
 Glu Asn Lys Ala Leu Asn Tyr Lys Asp Ser Leu Thr Asp Ser Pro Lys
 260 265 270
 Met Met Leu Glu Lys Gln Gln Gln Ser Leu Pro Leu Lys His Thr Glu
 275 280 285
 Lys Cys Thr Glu Ser Ser Val Tyr Trp Pro Thr Lys Arg Gly Ile Thr
 290 295 300
 Ile Tyr Ala Asp Pro Asp Val Pro Ser Val Ser Gly Ser Ser Gln Arg
 305 310 315 320
 Pro Asn Glu Lys Pro Leu Arg Leu Thr Glu Lys Lys Asp Cys Asp Glu
 325 330 335
 Lys Asn Gly Cys Val Lys Leu Leu Gln Phe Leu Asn Pro Asp Pro Leu
 340 345 350
 Arg Ala Asp Gly Thr Ser Asp Leu His Gln Leu Gln Lys Val Lys Leu
 355 360 365
 Gly Thr Leu Gln Pro Gly Val Val Leu Arg Asn Arg Ile Glu Pro Cys
 370 375 380
 Leu Thr Leu Glu Lys Ser Pro Leu Ser Ala Asp Leu Lys Lys Val Asn
 385 390 395 400
 Met Phe Leu Lys Pro Asp Ser
 405

```
<210> 29
<211> 1301
<212> DNA
<213> Homo sapiens
```

$\langle 220 \rangle$
 $\langle 221 \rangle$ CDS
 $\langle 222 \rangle$ (97) .. (1167)

[illegible]

135	140	145	150	
act ata aaa gat gaa aaa gtt tgt gtt aat gat gat ctt gtt gca aag				594
Thr Ile Lys Asp Glu Lys Val Cys Val Asn Asp Asp Leu Val Ala Lys				
	155	160	165	
aac tat gct tgt tat atg tca cct aca aag aat aaa aac ctt gat tat				642
Asn Tyr Ala Cys Tyr Met Ser Pro Thr Lys Asn Lys Asn Leu Asp Tyr				
	170	175	180	
tta gaa aaa cca aga ttg aat ata aaa tca gca ccc tcc ttc aat aaa				690
Leu Glu Lys Pro Arg Leu Asn Ile Lys Ser Ala Pro Ser Phe Asn Lys				
	185	190	195	
ctc aat cca gca ctt aca ctc tgg cca atg ttt ttg caa gga aaa gat				738
Leu Asn Pro Ala Leu Thr Leu Trp Pro Met Phe Leu Gln Gly Lys Asp				
	200	205	210	
gtt caa gga atg gaa gat tca cat ggt gta aat ttt ccg gca caa tct				786
Val Gln Gly Met Glu Asp Ser His Gly Val Asn Phe Pro Ala Gln Ser				
	215	220	225	230
ctg caa cat aca tgg tgc aag ggt att gtc ggt gac ctc agg cca aca				834
Leu Gln His Thr Trp Cys Lys Gly Ile Val Gly Asp Leu Arg Pro Thr				
	235	240	245	
gcc aca gca cag gac aaa gct gta aaa tgt aat atg gat tca ttg aga				882
Ala Thr Ala Gln Asp Lys Ala Val Lys Cys Asn Met Asp Ser Leu Arg				
	250	255	260	
gat tca cct aaa gac aaa tct gaa aag aaa cac cat tgc atc tct tta				930
Asp Ser Pro Lys Asp Lys Ser Glu Lys Lys His His Cys Ile Ser Leu				
	265	270	275	
aaa gat aca aat aag cgt gtt gaa tcc tca gtg tac tgg cca gca aaa				978
Lys Asp Thr Asn Lys Arg Val Glu Ser Ser Val Tyr Trp Pro Ala Lys				
	280	285	290	
aga ggc ata acc ata tat gct gat cca gat gta cca gaa gca agt gct				1026
Arg Gly Ile Thr Ile Tyr Ala Asp Pro Asp Val Pro Glu Ala Ser Ala				
	295	300	305	310
tta agt cag aag tca aat gag aaa cct ctt aga ttg act gag aag aaa				1074
Leu Ser Gln Lys Ser Asn Glu Lys Pro Leu Arg Leu Thr Glu Lys Lys				
	315	320	325	
gaa tat gat gag aag aat agc tgt gtg aaa tta ctg cag ttt tta aat				1122
Glu Tyr Asp Glu Lys Asn Ser Cys Val Lys Leu Leu Gln Phe Leu Asn				
	330	335	340	

cct gat cct ttg aga gct gac gga atc tct gat ctc cag cag act 1167
 Pro Asp Pro Leu Arg Ala Asp Gly Ile Ser Asp Leu Gln Gln Thr
 345 350 355

tgagattaga agagaaactc cttagatggg ggacttaacc tgaagacatc cttttagaaa 1227

cgatcgaatg gattgttgct tctgagaaat tgcticcttgt tttttggata ataaacgatc 1287

ttccttttgg taaa 1301

<210> 30

<211> 357

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 30

Met Asn Asp Phe Tyr Asn Ser Thr Cys Gln Asp Ile Glu Ile Lys Pro
 1 5 10 15

Leu Thr Leu Glu Glu Gly Gln Val Cys Val Val Tyr Cys Glu Glu Leu
 20 25 30

Lys Cys Trp Cys Arg Ala Ile Val Lys Ser Ile Thr Ser Ser Ala Asp
 35 40 45

Gln Tyr Leu Ala Glu Cys Phe Leu Val Asp Phe Ala Lys Asn Ile Pro
 50 55 60

Val Lys Ser Lys Ser Ile Arg Val Val Val Glu Ser Phe Met Gln Leu
 65 70 75 80

Pro Tyr Arg Ala Lys Lys Phe Ser Leu Tyr Cys Thr Lys Pro Val Thr
 85 90 95

Leu His Ile Asp Phe Cys Arg Asp Ser Thr Asp Ile Val Pro Ala Lys
 100 105 110

Lys Trp Asp Asn Ala Ala Ile Gln Tyr Phe Gln Asn Leu Leu Lys Ala
 115 120 125

Thr Thr Gln Val Glu Ala Arg Leu Cys Ala Val Glu Glu Asp Thr Phe
 130 135 140

Glu Val Tyr Leu Tyr Val Thr Ile Lys Asp Glu Lys Val Cys Val Asn
 145 150 155 160

Asp Asp Leu Val Ala Lys Asn Tyr Ala Cys Tyr Met Ser Pro Thr Lys
 165 170 175

Asn Lys Asn Leu Asp Tyr Leu Glu Lys Pro Arg Leu Asn Ile Lys Ser
180 185 190

Ala Pro Ser Phe Asn Lys Leu Asn Pro Ala Leu Thr Leu Trp Pro Met
195 200 205

Phe Leu Gln Gly Lys Asp Val Gln Gly Met Glu Asp Ser His Gly Val
210 215 220

Asn Phe Pro Ala Gln Ser Leu Gln His Thr Trp Cys Lys Gly Ile Val
225 230 235 240

Gly Asp Leu Arg Pro Thr Ala Thr Ala Gln Asp Lys Ala Val Lys Cys
245 250 255

Asn Met Asp Ser Leu Arg Asp Ser Pro Lys Asp Lys Ser Glu Lys Lys
260 265 270

His His Cys Ile Ser Leu Lys Asp Thr Asn Lys Arg Val Glu Ser Ser
275 280 285

Val Tyr Trp Pro Ala Lys Arg Gly Ile Thr Ile Tyr Ala Asp Pro Asp
290 295 300

Val Pro Glu Ala Ser Ala Leu Ser Gln Lys Ser Asn Glu Lys Pro Leu
305 310 315 320

Arg Leu Thr Glu Lys Lys Glu Tyr Asp Glu Lys Asn Ser Cys Val Lys
325 330 335

Leu Leu Gln Phe Leu Asn Pro Asp Pro Leu Arg Ala Asp Gly Ile Ser
340 345 350

Asp Leu Gln Gln Thr
355

<210> 31

<211> 1280

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220>

<221> CDS

<222> (122)..(1219)

<400> 31

tgaggggctg agaagagagc aattcacact tgattagctc ccaggctcct gaattgagca 60

gaggaggcta gaccgctgag ctgcgcaccc cagaggctgc tctaccctgg ctcagacgac 120

c atg cag cct tat caa cgg ctt ctg gcg ctt ggc ttc ctt ctg tta acc 169
Met Gln Pro Tyr Gln Arg Leu Leu Ala Leu Gly Phe Leu Leu Leu Thr
1 5 10 15

ctg ccc tgg ggc cag aca tcc gag ttt caa gac tct gac ctt ttg cag 217
Leu Pro Trp Gly Gln Thr Ser Glu Phe Gln Asp Ser Asp Leu Leu Gln
20 25 30

ttt ctg gga tta gag aaa gcg cct tca cct cac agg ttc caa cct gtg 265
Phe Leu Gly Leu Glu Lys Ala Pro Ser Pro His Arg Phe Gln Pro Val
35 40 45

cct cgc gtc tta agg aaa atc atc cgg gct cga gaa gcc gct gca gcc 313
Pro Arg Val Leu Arg Lys Ile Ile Arg Ala Arg Glu Ala Ala Ala Ala
50 55 60

agt ggg gcc tcg cag gac tta tgc tac gtg aag gag ctg ggt gtt cgt 361
Ser Gly Ala Ser Gln Asp Leu Cys Tyr Val Lys Glu Leu Gly Val Arg
65 70 75 80

ggg aac ctg ctt cag ctt ctc cca gac cag ggt ttt ttc ctt aat aca 409
Gly Asn Leu Leu Gln Leu Leu Pro Asp Gln Gly Phe Phe Leu Asn Thr
85 90 95

cag aaa cct ttc caa gat ggc tcc tgt ctc cag aag gtc ctc tat ttt 457
Gln Lys Pro Phe Gln Asp Gly Ser Cys Leu Gln Lys Val Leu Tyr Phe
100 105 110

aac ttg tct gcc atc aaa gaa aag gca aag ttg acc atg gcc cag ctg 505
Asn Leu Ser Ala Ile Lys Glu Lys Ala Lys Leu Thr Met Ala Gln Leu
115 120 125

act cta gac ttg ggg ccc agg tcc tac tat aac ctg cga cca gag ctg 553
Thr Leu Asp Leu Gly Pro Arg Ser Tyr Tyr Asn Leu Arg Pro Glu Leu
130 135 140

gtg gtt gct ctg tct gtg gtt cag gac cgg ggc gtg tgg ggg cga tcc 601
Val Val Ala Leu Ser Val Val Gln Asp Arg Gly Val Trp Gly Arg Ser
145 150 155 160

cac cct aag gtg ggc aga ttg ctt ttt ctg cgg tct gtc cct ggg cct 649
His Pro Lys Val Gly Arg Leu Leu Phe Leu Arg Ser Val Pro Gly Pro
165 170 175

caa ggt cag ctc cag ttc aac ctg cag ggt gcg ctt aag gat tgg agc 697
Gln Gly Gln Leu Gln Phe Asn Leu Gln Gly Ala Leu Lys Asp Trp Ser
180 185 190

agc aac cga ctg aag aat ttg gac tta cac tta gag att ttg gtc aaa 745
 Ser Asn Arg Leu Lys Asn Leu Asp Leu His Leu Glu Ile Leu Val Lys
 195 200 205

gag gac aga tac tcc agg gta act gtc cag ccc gag aac ccc tgt gac 793
 Glu Asp Arg Tyr Ser Arg Val Thr Val Gln Pro Glu Asn Pro Cys Asp
 210 215 220

ccg ctg ctc cgc tct cta cat gcc tcg ctg ctg gtg gta acc ctc aat 841
 Pro Leu Leu Arg Ser Leu His Ala Ser Leu Leu Val Val Thr Leu Asn
 225 230 235 240

cct aaa cac tgt cat cct tct tcc aga aaa agg agg gcg gcc atc tct 889
 Pro Lys His Cys His Pro Ser Ser Arg Lys Arg Arg Ala Ala Ile Ser
 245 250 255

gtc ccc aag ggt ttc tgt agg aac ttc tgc cac cgt cat cag ctg ttc 937
 Val Pro Lys Gly Phe Cys Arg Asn Phe Cys His Arg His Gln Leu Phe
 260 265 270

atc aac ttc cag gac ctg ggt tgg cac aag tgg gtc atc gcc cct aag 985
 Ile Asn Phe Gln Asp Leu Gly Trp His Lys Trp Val Ile Ala Pro Lys
 275 280 285

ggg ttc atg gca aat tac tgt cat gga gag tgc ccc ttc tca atg acc 1033
 Gly Phe Met Ala Asn Tyr Cys His Gly Glu Cys Pro Phe Ser Met Thr
 290 295 300

acg tat tta aat agt tcc aat tat gct ttc atg cag gct ctg atg cat 1081
 Thr Tyr Leu Asn Ser Ser Asn Tyr Ala Phe Met Gln Ala Leu Met His
 305 310 315 320

atg gct gac ccc aag gtc ccc aag gct gtc tgt gtc ccc acc aag ctc 1129
 Met Ala Asp Pro Lys Val Pro Lys Ala Val Cys Val Pro Thr Lys Leu
 325 330 335

tcg ccc atc tcc atg ctc tat cag gat agt gat aag aac gtc att ctc 1177
 Ser Pro Ile Ser Met Leu Tyr Gln Asp Ser Asp Lys Asn Val Ile Leu
 340 345 350

cga cat tat gaa gac atg gta gtc gat gag tgt ggg tgt ggg 1219
 Arg His Tyr Glu Asp Met Val Val Asp Glu Cys Gly Cys Gly
 355 360 365

tagtctcggg actaggctag gagtgtgctt agggtaaadc cttaataaaa actaccaccc 1279

c 1280

<211> 366
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 32

Met Gln Pro Tyr Gln Arg Leu Leu Ala Leu Gly Phe Leu Leu Leu Thr
 1 5 10 15

Leu Pro Trp Gly Gln Thr Ser Glu Phe Gln Asp Ser Asp Leu Leu Gln
 20 25 30

Phe Leu Gly Leu Glu Lys Ala Pro Ser Pro His Arg Phe Gln Pro Val
 35 40 45

Pro Arg Val Leu Arg Lys Ile Ile Arg Ala Arg Glu Ala Ala Ala Ala
 50 55 60

Ser Gly Ala Ser Gln Asp Leu Cys Tyr Val Lys Glu Leu Gly Val Arg
 65 70 75 80

Gly Asn Leu Leu Gln Leu Leu Pro Asp Gln Gly Phe Phe Leu Asn Thr
 85 90 95

Gln Lys Pro Phe Gln Asp Gly Ser Cys Leu Gln Lys Val Leu Tyr Phe
 100 105 110

Asn Leu Ser Ala Ile Lys Glu Lys Ala Lys Leu Thr Met Ala Gln Leu
 115 120 125

Thr Leu Asp Leu Gly Pro Arg Ser Tyr Tyr Asn Leu Arg Pro Glu Leu
 130 135 140

Val Val Ala Leu Ser Val Val Gln Asp Arg Gly Val Trp Gly Arg Ser
 145 150 155 160

His Pro Lys Val Gly Arg Leu Leu Phe Leu Arg Ser Val Pro Gly Pro
 165 170 175

Gln Gly Gln Leu Gln Phe Asn Leu Gln Gly Ala Leu Lys Asp Trp Ser
 180 185 190

Ser Asn Arg Leu Lys Asn Leu Asp Leu His Leu Glu Ile Leu Val Lys
 195 200 205

Glu Asp Arg Tyr Ser Arg Val Thr Val Gln Pro Glu Asn Pro Cys Asp
 210 215 220

Pro Leu Leu Arg Ser Leu His Ala Ser Leu Leu Val Val Thr Leu Asn
 225 230 235 240

出証特 2 0 0 5 - 3 0 2 6 8 8 6

40	45	50	
ttc cag gat cgc gag gca gca gcg acc act ggg gtc tcc cga gac tta			246
Phe Gln Asp Arg Glu Ala Ala Ala Thr Thr Gly Val Ser Arg Asp Leu			
55	60	65	70
tgc tac gta aag gag ctg ggc gtc cgc ggg aat gta ctt cgc ttt ctc			294
Cys Tyr Val Lys Glu Leu Gly Val Arg Gly Asn Val Leu Arg Phe Leu			
	75	80	85
cca gac caa ggt ttc ttt ctt tac cca aag aaa att tcc caa gct tcc			342
Pro Asp Gln Gly Phe Phe Leu Tyr Pro Lys Lys Ile Ser Gln Ala Ser			
	90	95	100
tcc tgc ctg cag aag ctc ctc tac ttt aac ctg tct gcc atc aaa gaa			390
Ser Cys Leu Gln Lys Leu Leu Tyr Phe Asn Leu Ser Ala Ile Lys Glu			
	105	110	115
agg gaa cag ttg aca ttg gcc cag ctg ggc ctg gac ttg ggg ccc aat			438
Arg Glu Gln Leu Thr Leu Ala Gln Leu Gly Leu Asp Leu Gly Pro Asn			
	120	125	130
tct tac tat aac ctg gga cca gag ctg gaa ctg gct ctg ttc ctg gtt			486
Ser Tyr Tyr Asn Leu Gly Pro Glu Leu Glu Leu Ala Leu Phe Leu Val			
135	140	145	150
cag gag cct cat gtg tgg ggc cag acc acc cct aag cca ggt aaa atg			534
Gln Glu Pro His Val Trp Gly Gln Thr Thr Pro Lys Pro Gly Lys Met			
	155	160	165
ttt gtg ttg cgg tca gtc cca tgg cca caa ggt gct gtt cac ttc aac			582
Phe Val Leu Arg Ser Val Pro Trp Pro Gln Gly Ala Val His Phe Asn			
	170	175	180
ctg ctg gat gta gct aag gat tgg aat gac aac ccc cgg aaa aat ttc			630
Leu Leu Asp Val Ala Lys Asp Trp Asn Asp Asn Pro Arg Lys Asn Phe			
	185	190	195
ggg tta ttc ctg gag ata ctg gtc aaa gaa gat aga gac tca ggg gtg			678
Gly Leu Phe Leu Glu Ile Leu Val Lys Glu Asp Arg Asp Ser Gly Val			
200	205	210	
aat ttt cag cct gaa gac acc tgt gcc aga cta aga tgc tcc ctt cat			726
Asn Phe Gln Pro Glu Asp Thr Cys Ala Arg Leu Arg Cys Ser Leu His			
215	220	225	230
gct tcc ctg ctg gtg gtg act ctc aac cct gat cag tgc cac cct tct			774
Ala Ser Leu Leu Val Val Thr Leu Asn Pro Asp Gln Cys His Pro Ser			
	235	240	245

cgg aaa agg aga gca gcc atc cct gtc ccc aag ctt tct tgt aag aac 822
 Arg Lys Arg Arg Ala Ala Ile Pro Val Pro Lys Leu Ser Cys Lys Asn
 250 255 260

ctc tgc cac cgt cac cag cta ttc att aac ttc cgg gac ctg ggt tgg 870
 Leu Cys His Arg His Gln Leu Phe Ile Asn Phe Arg Asp Leu Gly Trp
 265 270 275

cac aag tgg atc att gcc ccc aag ggg ttc atg gca aat tac tgc cat 918
 His Lys Trp Ile Ile Ala Pro Lys Gly Phe Met Ala Asn Tyr Cys His
 280 285 290

gga gag tgt ccc ttc tca ctg acc atc tct ctc aac agc tcc aat tat 966
 Gly Glu Cys Pro Phe Ser Leu Thr Ile Ser Leu Asn Ser Ser Asn Tyr
 295 300 305 310

gct ttc atg caa gcc ctg atg cat gcc gtt gac cca gag atc ccc cag 1014
 Ala Phe Met Gln Ala Leu Met His Ala Val Asp Pro Glu Ile Pro Gln
 315 320 325

gct gtg tgt atc ccc acc aag ctg tct ccc att tcc atg ctc tac cag 1062
 Ala Val Cys Ile Pro Thr Lys Leu Ser Pro Ile Ser Met Leu Tyr Gln
 330 335 340

gac aat aat gac aat gtc att cta cga cat tat gaa gac atg gta gtc 1110
 Asp Asn Asn Asp Asn Val Ile Leu Arg His Tyr Glu Asp Met Val Val
 345 350 355

gat gaa tgt ggg tgt ggg taggatgtca gaaatgggaa tagaaggagt 1158
 Asp Glu Cys Gly Cys Gly
 360

gttcttaggg taaatctttt aataaaacta cctatctggt ttatgaccac ttagatcgaa 1218
 atgtca 1224

<210> 34
 <211> 364
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 34
 Met Leu Arg Phe Leu Pro Asp Leu Ala Phe Ser Phe Leu Leu Ile Leu
 1 5 10 15

Ala Leu Gly Gln Ala Val Gln Phe Gln Glu Tyr Val Phe Leu Gln Phe
 20 25 30

Leu Gly Leu Asp Lys Ala Pro Ser Pro Gln Lys Phe Gln Pro Val Pro

35	40	45
Tyr Ile Leu Lys Lys Ile Phe Gln Asp Arg Glu Ala Ala Ala Thr Thr		
50	55	60
Gly Val Ser Arg Asp Leu Cys Tyr Val Lys Glu Leu Gly Val Arg Gly		
65	70	75
Asn Val Leu Arg Phe Leu Pro Asp Gln Gly Phe Phe Leu Tyr Pro Lys		
	85	90
		95
Lys Ile Ser Gln Ala Ser Ser Cys Leu Gln Lys Leu Leu Tyr Phe Asn		
	100	105
		110
Leu Ser Ala Ile Lys Glu Arg Glu Gln Leu Thr Leu Ala Gln Leu Gly		
	115	120
		125
Leu Asp Leu Gly Pro Asn Ser Tyr Tyr Asn Leu Gly Pro Glu Leu Glu		
	130	135
		140
Leu Ala Leu Phe Leu Val Gln Glu Pro His Val Trp Gly Gln Thr Thr		
	145	150
		155
		160
Pro Lys Pro Gly Lys Met Phe Val Leu Arg Ser Val Pro Trp Pro Gln		
	165	170
		175
Gly Ala Val His Phe Asn Leu Leu Asp Val Ala Lys Asp Trp Asn Asp		
	180	185
		190
Asn Pro Arg Lys Asn Phe Gly Leu Phe Leu Glu Ile Leu Val Lys Glu		
	195	200
		205
Asp Arg Asp Ser Gly Val Asn Phe Gln Pro Glu Asp Thr Cys Ala Arg		
	210	215
		220
Leu Arg Cys Ser Leu His Ala Ser Leu Leu Val Val Thr Leu Asn Pro		
	225	230
		235
		240
Asp Gln Cys His Pro Ser Arg Lys Arg Arg Ala Ala Ile Pro Val Pro		
	245	250
		255
Lys Leu Ser Cys Lys Asn Leu Cys His Arg His Gln Leu Phe Ile Asn		
	260	265
		270
Phe Arg Asp Leu Gly Trp His Lys Trp Ile Ile Ala Pro Lys Gly Phe		
	275	280
		285
Met Ala Asn Tyr Cys His Gly Glu Cys Pro Phe Ser Leu Thr Ile Ser		
	290	295
		300

Leu Asn Ser Ser Asn Tyr Ala Phe Met Gln Ala Leu Met His Ala Val
305 310 315 320

Asp Pro Glu Ile Pro Gln Ala Val Cys Ile Pro Thr Lys Leu Ser Pro
325 330 335

Ile Ser Met Leu Tyr Gln Asp Asn Asn Asp Asn Val Ile Leu Arg His
340 345 350

Tyr Glu Asp Met Val Val Asp Glu Cys Gly Cys Gly
355 360

<210> 35
<211> 1248
<212> DNA
<213> Mus musculus

<220>
<221> CDS
<222> (32)..(1003)

<400> 35
agtggatccc ccgggctgca ggaattccgg g atg gat cct cga acc tgg cta 52
Met Asp Pro Arg Thr Trp Leu
1 5

agc ttc caa ggg cct cca ggt ggg cct gga atc gga cca ggc tca gag 100
Ser Phe Gln Gly Pro Pro Gly Gly Pro Gly Ile Gly Pro Gly Ser Glu
10 15 20

gta ttg ggg atc tcc cca tgt ccg ccc gca tac gag ttc tgc gga ggg 148
Val Leu Gly Ile Ser Pro Cys Pro Pro Ala Tyr Glu Phe Cys Gly Gly
25 30 35

atg gca tac tgt gga cct cag gtt ggt ctg ggc cta gtc ccc caa gtt 196
Met Ala Tyr Cys Gly Pro Gln Val Gly Leu Gly Leu Val Pro Gln Val
40 45 50 55

ggc gtg gag act ttg cag cct gag ggc cag gca gga gca cga gtg gaa 244
Gly Val Glu Thr Leu Gln Pro Glu Gly Gln Ala Gly Ala Arg Val Glu
60 65 70

agc aac tca gag gga acc tcc tct gag ccc tgt gcc gac cgc ccc aat 292
Ser Asn Ser Glu Gly Thr Ser Ser Glu Pro Cys Ala Asp Arg Pro Asn
75 80 85

gcc gtg aag ttg gag aag gtg gaa cca act ccc gag gag tcc cag gac 340
Ala Val Lys Leu Glu Lys Val Glu Pro Thr Pro Glu Glu Ser Gln Asp

90	95	100	
atg aaa gcc ctg cag aag gag cta gaa cag ttt gcc aag ctg ctg aag			388
Met Lys Ala Leu Gln Lys Glu Leu Glu Gln Phe Ala Lys Leu Leu Lys			
105	110	115	
cag aag agg atc acc ttg ggg tac acc cag gcc gac gtg ggg ctc acc			436
Gln Lys Arg Ile Thr Leu Gly Tyr Thr Gln Ala Asp Val Gly Leu Thr			
120	125	130	135
ctg ggc gtt ctc ttt gga aag gtg ttc agc cag acc acc atc tgt cgc			484
Leu Gly Val Leu Phe Gly Lys Val Phe Ser Gln Thr Thr Ile Cys Arg			
140	145	150	
ttc gag gcc ttg cag ctc agc ctt aag aac atg tgt aag ctg cgg ccc			532
Phe Glu Ala Leu Gln Leu Ser Leu Lys Asn Met Cys Lys Leu Arg Pro			
155	160	165	
ctg ctg gag aag tgg gtg gag gaa gcc gac aac aat gag aac ctt cag			580
Leu Leu Glu Lys Trp Val Glu Glu Ala Asp Asn Asn Glu Asn Leu Gln			
170	175	180	
gag ata tgc aaa tcg gag acc ctg gtg cag gcc cgg aag aga aag cga			628
Glu Ile Cys Lys Ser Glu Thr Leu Val Gln Ala Arg Lys Arg Lys Arg			
185	190	195	
act agc att gag aac cgt gtg agg tgg agt ctg gag acc atg ttt ctg			676
Thr Ser Ile Glu Asn Arg Val Arg Trp Ser Leu Glu Thr Met Phe Leu			
200	205	210	215
aag tgc ccg aag ccc tcc cta cag cag atc act cac atc gcc aat cag			724
Lys Cys Pro Lys Pro Ser Leu Gln Gln Ile Thr His Ile Ala Asn Gln			
220	225	230	
ctt ggg cta gag aag gat gtg gtt cga gta tgg ttc tgt aac cgg cgc			772
Leu Gly Leu Glu Lys Asp Val Val Arg Val Trp Phe Cys Asn Arg Arg			
235	240	245	
cag aag ggc aaa aga tca agt att gag tat tcc caa cga gaa gag tat			820
Gln Lys Gly Lys Arg Ser Ser Ile Glu Tyr Ser Gln Arg Glu Glu Tyr			
250	255	260	
gag gct aca ggg aca cct ttc cca ggg ggg gct gta tcc ttt cct ctg			868
Glu Ala Thr Gly Thr Pro Phe Pro Gly Gly Ala Val Ser Phe Pro Leu			
265	270	275	
ccc cca ggt ccc cac ttt ggc acc cca ggc tat gga agc ccc cac ttc			916
Pro Pro Gly Pro His Phe Gly Thr Pro Gly Tyr Gly Ser Pro His Phe			
280	285	290	295

acc aca ctc tac tca gtc cct ttt cct gag ggc gag gcc ttt ccc tct 964
 Thr Thr Leu Tyr Ser Val Pro Phe Pro Glu Gly Glu Ala Phe Pro Ser
 300 305 310

gtt ccc gtc act gct ctg ggc tct ccc atg cat tca aac tgaggcacca 1013
 Val Pro Val Thr Ala Leu Gly Ser Pro Met His Ser Asn
 315 320

gccctccctg gggatgctgt gagccaaggc aaggaggta gacaagagaa cctggagctt 1073

tgggggttaaa ttcttttact gaggaggat taaaagcaca acaggggtgg ggggtgggat 1133

ggggaaagaa gctcagtgat gctgttgatc aggagcctgg cctgtctgtc actcatcatt 1193

ttgtttcttaa ataaagactg ggacacacag taaaaaaaaa aaaaaaaac tcgag 1248

<210> 36

<211> 324

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 36

Met Asp Pro Arg Thr Trp Leu Ser Phe Gln Gly Pro Pro Gly Gly Pro
 1 5 10 15

Gly Ile Gly Pro Gly Ser Glu Val Leu Gly Ile Ser Pro Cys Pro Pro
 20 25 30

Ala Tyr Glu Phe Cys Gly Gly Met Ala Tyr Cys Gly Pro Gln Val Gly
 35 40 45

Leu Gly Leu Val Pro Gln Val Gly Val Glu Thr Leu Gln Pro Glu Gly
 50 55 60

Gln Ala Gly Ala Arg Val Glu Ser Asn Ser Glu Gly Thr Ser Ser Glu
 65 70 75 80

Pro Cys Ala Asp Arg Pro Asn Ala Val Lys Leu Glu Lys Val Glu Pro
 85 90 95

Thr Pro Glu Glu Ser Gln Asp Met Lys Ala Leu Gln Lys Glu Leu Glu
 100 105 110

Gln Phe Ala Lys Leu Leu Lys Gln Lys Arg Ile Thr Leu Gly Tyr Thr
 115 120 125

Gln Ala Asp Val Gly Leu Thr Leu Gly Val Leu Phe Gly Lys Val Phe
 130 135 140

Ser Gln Thr Thr Ile Cys Arg Phe Glu Ala Leu Gln Leu Ser Leu Lys
145 150 155 160

Asn Met Cys Lys Leu Arg Pro Leu Leu Glu Lys Trp Val Glu Glu Ala
165 170 175

Asp Asn Asn Glu Asn Leu Gln Glu Ile Cys Lys Ser Glu Thr Leu Val
180 185 190

Gln Ala Arg Lys Arg Lys Arg Thr Ser Ile Glu Asn Arg Val Arg Trp
195 200 205

Ser Leu Glu Thr Met Phe Leu Lys Cys Pro Lys Pro Ser Leu Gln Gln
210 215 220

Ile Thr His Ile Ala Asn Gln Leu Gly Leu Glu Lys Asp Val Val Arg
225 230 235 240

Val Trp Phe Cys Asn Arg Arg Gln Lys Gly Lys Arg Ser Ser Ile Glu
245 250 255

Tyr Ser Gln Arg Glu Glu Tyr Glu Ala Thr Gly Thr Pro Phe Pro Gly
260 265 270

Gly Ala Val Ser Phe Pro Leu Pro Pro Gly Pro His Phe Gly Thr Pro
275 280 285

Gly Tyr Gly Ser Pro His Phe Thr Thr Leu Tyr Ser Val Pro Phe Pro
290 295 300

Glu Gly Glu Ala Phe Pro Ser Val Pro Val Thr Ala Leu Gly Ser Pro
305 310 315 320

Met His Ser Asn

<210> 37
<211> 1371
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (43)..(1122)

<400> 37
ctcatttcac caggccccgc gcttggggcg ccttccttcc cc atg gcg gga cac 54
Met Ala Gly His

1

ctg gct tcg gat ttc gcc ttc tcg ccc cct cca ggt ggt gga ggt gat	102
Leu Ala Ser Asp Phe Ala Phe Ser Pro Pro Pro Gly Gly Gly Gly Asp	
5 10 15 20	
ggg cca ggg ggg ccg gag ccg ggc tgg gtt gat cct cgg acc tgg cta	150
Gly Pro Gly Gly Pro Glu Pro Gly Trp Val Asp Pro Arg Thr Trp Leu	
25 30 35	
agc ttc caa ggc cct cct gga ggg cca gga atc ggg ccg ggg gtt ggg	198
Ser Phe Gln Gly Pro Pro Gly Gly Pro Gly Ile Gly Pro Gly Val Gly	
40 45 50	
cca ggc tct gag gtg tgg ggg att ccc cca tgc ccc ccg ccg tat gag	246
Pro Gly Ser Glu Val Trp Gly Ile Pro Pro Cys Pro Pro Pro Tyr Glu	
55 60 65	
ttc tgt ggg ggg atg gcg tac tgt ggg ccc cag gtt gga gtg ggg cta	294
Phe Cys Gly Gly Met Ala Tyr Cys Gly Pro Gln Val Gly Val Gly Leu	
70 75 80	
gtg ccc caa ggc ggc ttg gag acc tct cag cct gag ggc gaa gca gga	342
Val Pro Gln Gly Gly Leu Glu Thr Ser Gln Pro Glu Gly Glu Ala Gly	
85 90 95 100	
gtc ggg gtg gag agc aac tcc gat ggg gcc tcc ccg gag ccc tgc acc	390
Val Gly Val Glu Ser Asn Ser Asp Gly Ala Ser Pro Glu Pro Cys Thr	
105 110 115	
gtc acc cct ggt gcc gtg aag ctg gag aag gag aag ctg gag caa aac	438
Val Thr Pro Gly Ala Val Lys Leu Glu Lys Glu Lys Leu Glu Gln Asn	
120 125 130	
ccg gag gag tcc cag gac atc aaa gct ctg cag aaa gaa ctc gag caa	486
Pro Glu Glu Ser Gln Asp Ile Lys Ala Leu Gln Lys Glu Leu Glu Gln	
135 140 145	
ttt gcc aag ctc ctg aag cag aag agg atc acc ctg gga tat aca cag	534
Phe Ala Lys Leu Leu Lys Gln Lys Arg Ile Thr Leu Gly Tyr Thr Gln	
150 155 160	
gcc gat gtg ggg ctc acc ctg ggg gtt cta ttt ggg aag gta ttc agc	582
Ala Asp Val Gly Leu Thr Leu Gly Val Leu Phe Gly Lys Val Phe Ser	
165 170 175 180	
caa acg acc atc tgc cgc ttt gag gct ctg cag ctt agc ttc aag aac	630
Gln Thr Thr Ile Cys Arg Phe Glu Ala Leu Gln Leu Ser Phe Lys Asn	
185 190 195	

atg tgt aag ctg cgg ccc ttg ctg cag aag tgg gtg gag gaa gct gac 678
 Met Cys Lys Leu Arg Pro Leu Leu Gln Lys Trp Val Glu Glu Ala Asp
 200 205 210

aac aat gaa aat ctt cag gag ata tgc aaa gca gaa acc ctc gtg cag 726
 Asn Asn Glu Asn Leu Gln Glu Ile Cys Lys Ala Glu Thr Leu Val Gln
 215 220 225

gcc cga aag aga aag cga acc agt atc gag aac cga gtg aga ggc aac 774
 Ala Arg Lys Arg Lys Arg Thr Ser Ile Glu Asn Arg Val Arg Gly Asn
 230 235 240

ctg gag aat ttg ttc ctg cag tgc ccg aaa ccc aca ctg cag cag atc 822
 Leu Glu Asn Leu Phe Leu Gln Cys Pro Lys Pro Thr Leu Gln Gln Ile
 245 250 255 260

agc cac atc gcc cag cag ctt ggg ctc gag aag gat gtg gtc cga gtg 870
 Ser His Ile Ala Gln Gln Leu Gly Leu Glu Lys Asp Val Val Arg Val
 265 270 275

tgg ttc tgt aac cgg cgc cag aag ggc aag cga tca agc agc gac tat 918
 Trp Phe Cys Asn Arg Arg Gln Lys Gly Lys Arg Ser Ser Ser Asp Tyr
 280 285 290

gca caa cga gag gat ttt gag gct gct ggg tct cct ttc tca ggg gga 966
 Ala Gln Arg Glu Asp Phe Glu Ala Ala Gly Ser Pro Phe Ser Gly Gly
 295 300 305

cca gtg tcc ttt cct ctg gcc cca ggg ccc cat ttt ggt acc cca ggc 1014
 Pro Val Ser Phe Pro Leu Ala Pro Gly Pro His Phe Gly Thr Pro Gly
 310 315 320

tat ggg agc cct cac ttc act gca ctg tac tcc tcg gtc cct ttc cct 1062
 Tyr Gly Ser Pro His Phe Thr Ala Leu Tyr Ser Ser Val Pro Phe Pro
 325 330 335 340

gag ggg gaa gcc ttt ccc cct gtc tct gtc acc act ctg ggc tct ccc 1110
 Glu Gly Glu Ala Phe Pro Pro Val Ser Val Thr Thr Leu Gly Ser Pro
 345 350 355

atg cat tca aac tgaggtgcct gcccttctag gaatggggga cagggggagg 1162
 Met His Ser Asn
 360

ggaggagcta gggaaagaaa acctggagtt tgtgccaggg tttttggatt aagttcttca 1222

ttcactaagg aaggaattgg gaacacaaag ggtgggggca ggggagtttg gggcaactgg 1282

ttggagggaa ggtgaagttc aatgatgctc ttgattttta tcccatca tgtatcactt 1342

ttttcttaaa taaagaagct tgggacaca

1371

<210> 38

<211> 360

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 38

Met Ala Gly His Leu Ala Ser Asp Phe Ala Phe Ser Pro Pro Pro Gly
 1 5 10 15

Gly Gly Gly Asp Gly Pro Gly Gly Pro Glu Pro Gly Trp Val Asp Pro
 20 25 30

Arg Thr Trp Leu Ser Phe Gln Gly Pro Pro Gly Gly Pro Gly Ile Gly
 35 40 45

Pro Gly Val Gly Pro Gly Ser Glu Val Trp Gly Ile Pro Pro Cys Pro
 50 55 60

Pro Pro Tyr Glu Phe Cys Gly Gly Met Ala Tyr Cys Gly Pro Gln Val
 65 70 75 80

Gly Val Gly Leu Val Pro Gln Gly Gly Leu Glu Thr Ser Gln Pro Glu
 85 90 95

Gly Glu Ala Gly Val Gly Val Glu Ser Asn Ser Asp Gly Ala Ser Pro
 100 105 110

Glu Pro Cys Thr Val Thr Pro Gly Ala Val Lys Leu Glu Lys Glu Lys
 115 120 125

Leu Glu Gln Asn Pro Glu Glu Ser Gln Asp Ile Lys Ala Leu Gln Lys
 130 135 140

Glu Leu Glu Gln Phe Ala Lys Leu Leu Lys Gln Lys Arg Ile Thr Leu
 145 150 155 160

Gly Tyr Thr Gln Ala Asp Val Gly Leu Thr Leu Gly Val Leu Phe Gly
 165 170 175

Lys Val Phe Ser Gln Thr Thr Ile Cys Arg Phe Glu Ala Leu Gln Leu
 180 185 190

Ser Phe Lys Asn Met Cys Lys Leu Arg Pro Leu Leu Gln Lys Trp Val
 195 200 205

Glu Glu Ala Asp Asn Asn Glu Asn Leu Gln Glu Ile Cys Lys Ala Glu
 210 215 220

Thr Leu Val Gln Ala Arg Lys Arg Lys Arg Thr Ser Ile Glu Asn Arg
225 230 235 240

Val Arg Gly Asn Leu Glu Asn Leu Phe Leu Gln Cys Pro Lys Pro Thr
245 250 255

Leu Gln Gln Ile Ser His Ile Ala Gln Gln Leu Gly Leu Glu Lys Asp
260 265 270

Val Val Arg Val Trp Phe Cys Asn Arg Arg Gln Lys Gly Lys Arg Ser
275 280 285

Ser Ser Asp Tyr Ala Gln Arg Glu Asp Phe Glu Ala Ala Gly Ser Pro
290 295 300

Phe Ser Gly Gly Pro Val Ser Phe Pro Leu Ala Pro Gly Pro His Phe
305 310 315 320

Gly Thr Pro Gly Tyr Gly Ser Pro His Phe Thr Ala Leu Tyr Ser Ser
325 330 335

Val Pro Phe Pro Glu Gly Glu Ala Phe Pro Pro Val Ser Val Thr Thr
340 345 350

Leu Gly Ser Pro Met His Ser Asn
355 360

<210> 39

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 39

agggtctgct actgagatgc tctg

24

<210> 40

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 40
aggcaggtct tcagaggaag ggcg

24

<210> 41
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 41
cgggctgtag acctgtctgc attctg

26

<210> 42
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 42
ggtccttctg tctcatcctc gagagt

26

<210> 43
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 43
accaaggtca ccgcatccaa

20

<210> 44
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 44
cttcaccaag atttccgatg

20

<210> 45
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 45
gaatggtgga ctagcttttg

20

<210> 46
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 46
tgccatgaat gtcgatatgc ag

22

<210> 47
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 47
ccgcggaaag tcaagagatt gggtagg

26

<210> 48
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 48
gcggccgcct ttacgggtca cgagggtcac

30

<210> 49
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:primer

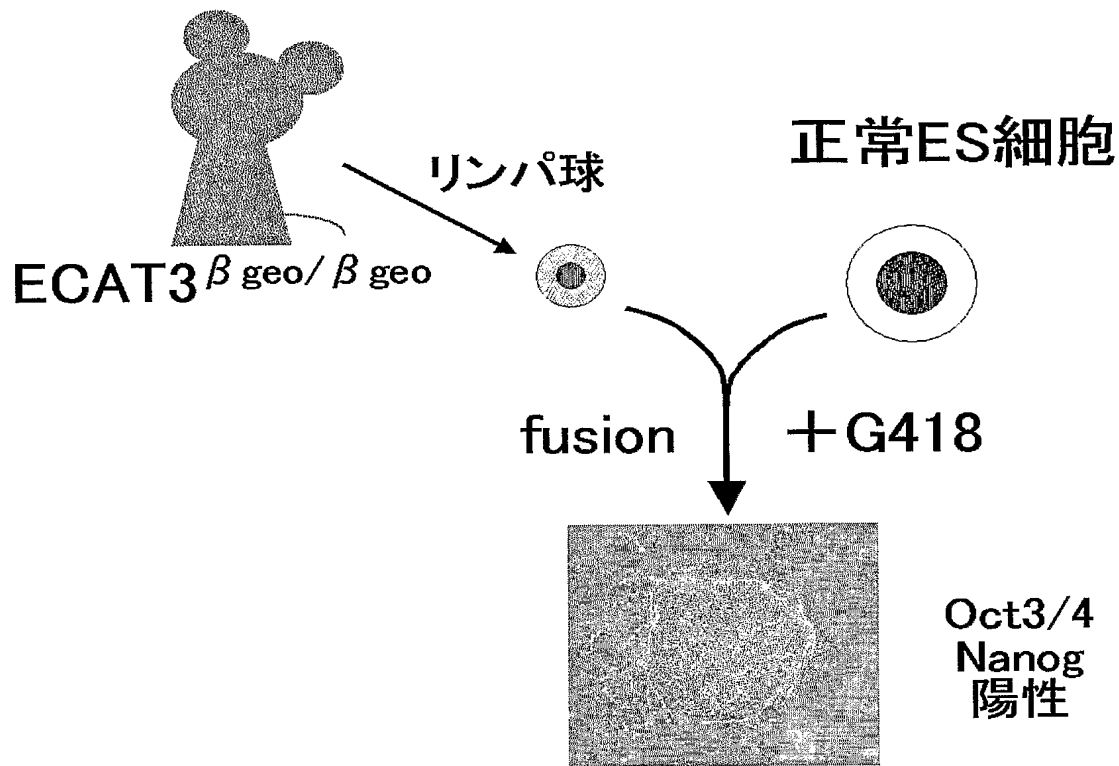
<400> 49
tgtggccagt gtttggttct ggcggg 26

<210> 50
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

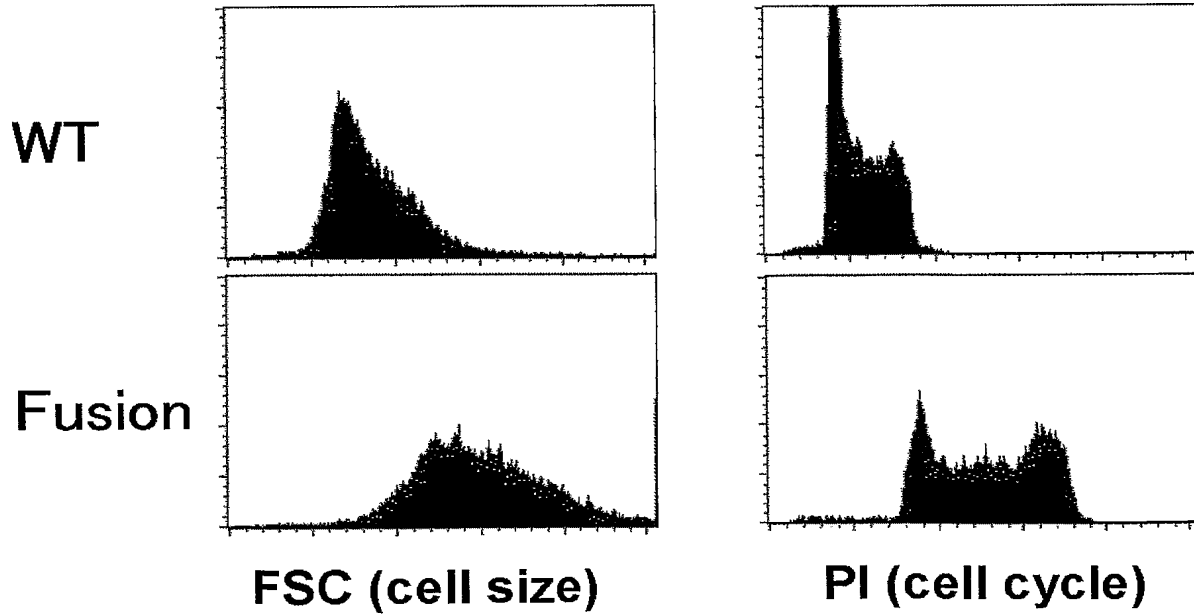
<220>
<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 50
ctcgaggact cgccattcta gccaaag 26

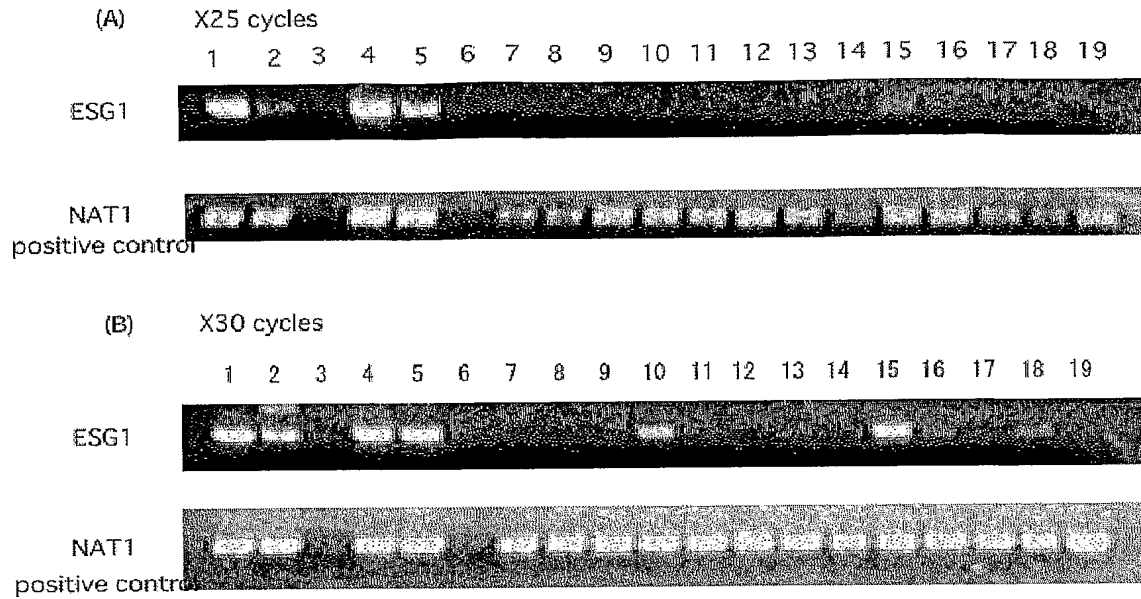
【書類名】図面
【図 1】



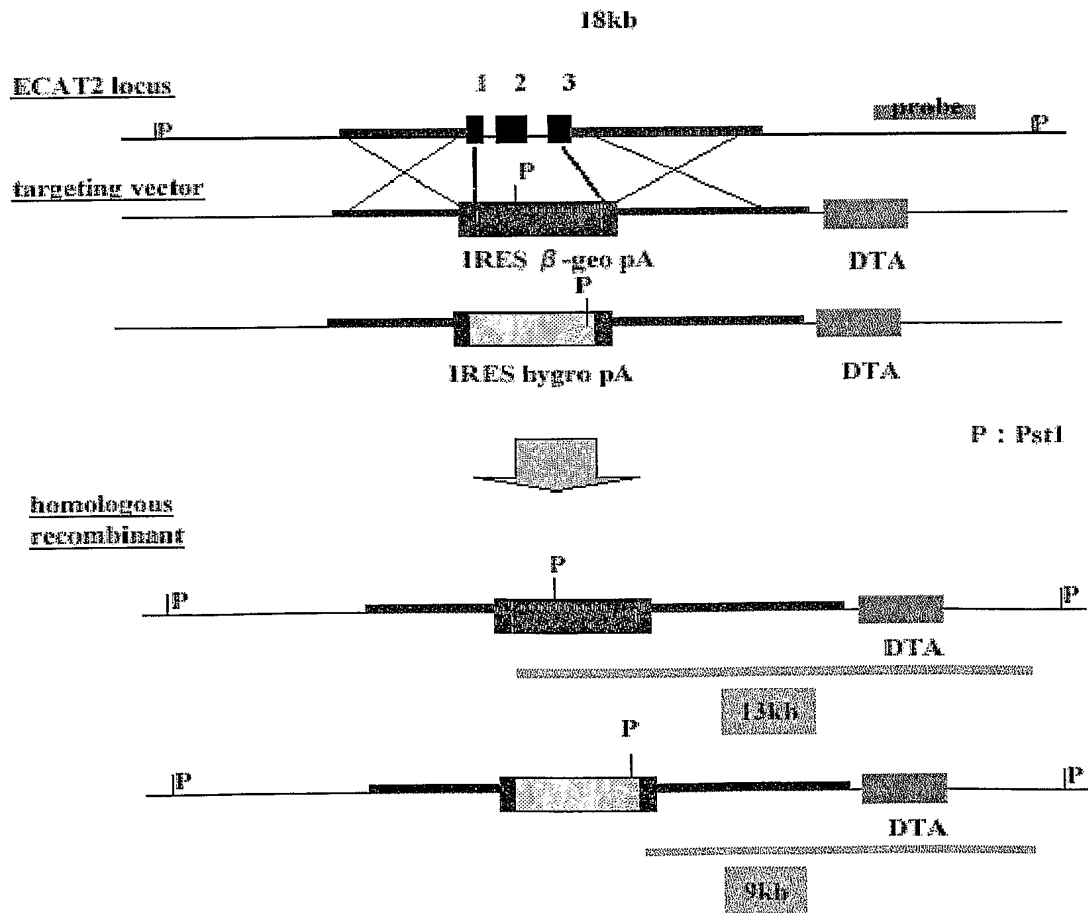
【図 2】



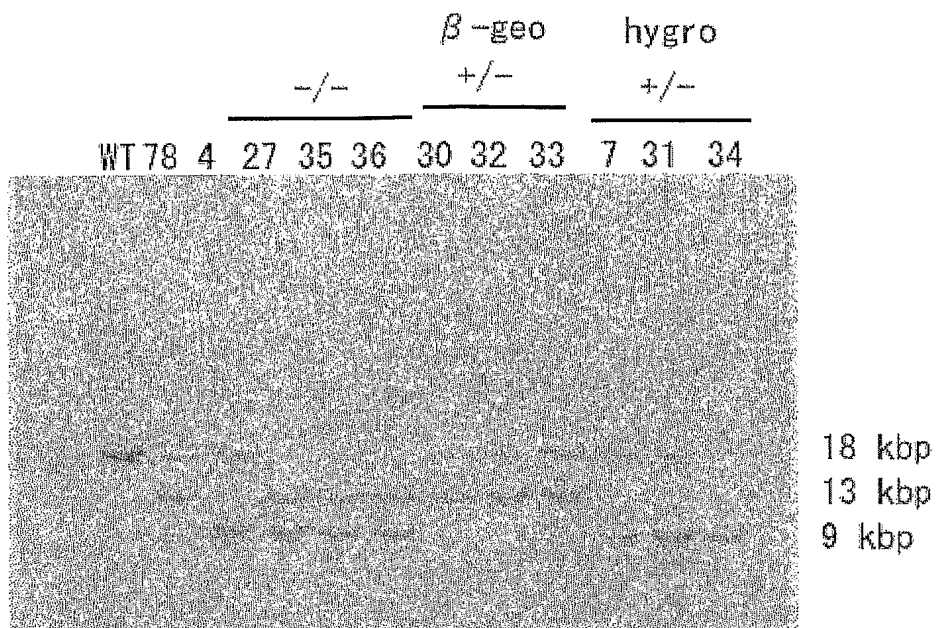
【図 3】



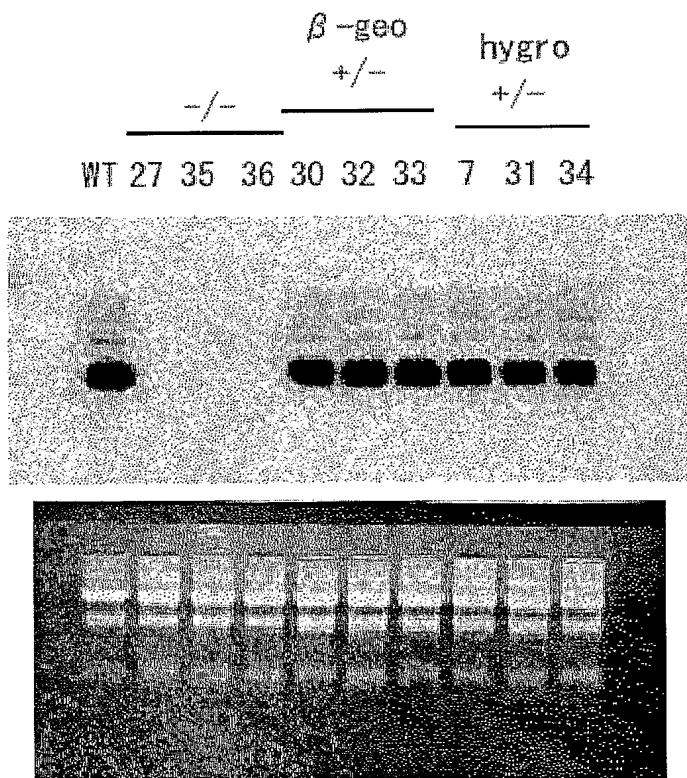
【図 4】



【図 5】



【図 6】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 体細胞核初期化物質の新規なスクリーニング方法を提供する。

【解決手段】 (a) E C A T 遺伝子の発現調節領域により発現調節を受ける位置にマーカー遺伝子を存在させた遺伝子を含有する体細胞と、被験物質とを接触させる工程、および (b) 前記 (a) の工程の後、マーカー遺伝子発現細胞の出現の有無を調べ、該細胞を出現させた被験物質を体細胞の核初期化候補物質として選択する工程を含む、体細胞の核初期化物質のスクリーニング方法等。

【選択図】 なし

認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2 0 0 4 - 2 3 2 9 6 1
受付番号	5 0 4 0 1 3 4 8 1 3 0
書類名	特許願
担当官	笹川 友子 9 4 8 2
作成日	平成 1 6 年 9 月 1 0 日

< 認定情報・付加情報 >

【提出日】	平成 1 6 年 8 月 1 0 日
-------	--------------------

特願 2 0 0 4 - 2 3 2 9 6 1

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [5 0 1 2 1 9 3 1 2]

1. 変更年月日 2 0 0 1 年 5 月 3 1 日

[変更理由] 新規登録

住 所 大阪府大阪市天王寺区堂ヶ芝 2 - 9 - 7 - 1 4 0 1

氏 名 山中 伸弥

特願 2 0 0 4 - 2 3 2 9 6 1

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [0 0 0 1 8 3 3 7 0]

1. 変更年月日 1 9 9 0 年 8 月 9 日

[変更理由] 新規登録

住 所 大阪府大阪市中心区道修町 2 丁目 2 番 8 号

氏 名 住友製薬株式会社